



**Nuno Ilídio Pereira  
Valente**

**Análise de Pesticidas Organofosforados em  
Toxicologia Forense**





**Nuno Ilídio Pereira  
Valente**

**Análise de Pesticidas Organofosforados em  
Toxicologia Forense**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, ramo de Química Analítica e Qualidade, realizado sob a orientação científica do Doutor Armando Silvestre, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coorientação da Mestre Sónia Tarelho e do Mestre André Castro, ambos Especialistas Superiores de Medicina Legal do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, Instituto Público.



Dedico este trabalho aos meus pais e irmão por todo o apoio.



## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Artur Manuel Soares da Silva**  
professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Dr. César João Santos Oliveira**  
investigador auxiliar do Centro de Química da Universidade do Minho

**Prof. Dr. Armando Jorge Domingues Silvestre**  
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Mestre Sónia Maria Lemos Heleno Tarelho**  
especialista superior de medicina legal principal no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

**Mestre André Alexandre Lobo Lopes de Castro**  
especialista superior de medicina legal de 1ª Classe no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.





## **agradecimentos**

Este foi, sem dúvida, um ano em que muito aprendi e muito cresci. Novas aventuras, novas oportunidades, novos desafios me surgiram e, acredito, me tornaram mais capaz de enfrentar o futuro. A meu lado, estiveram presentes várias pessoas às quais não posso deixar de agradecer.

Agradeço ao professor doutor Armando Silvestre pelos conhecimentos, exigência e rigor transmitidos ao longo de todo o trabalho.

Aos coorientadores, mestres André Castro e Sónia Tarelho, por tudo. Foram mesmo uns mestres. Obrigado por terem proposto este tema de tese, pelas inúmeras lições, pela vossa visão da realidade, em particular, da realidade fora de um meio essencialmente académico. Ao engenheiro Pedro Costa pelo apoio na parte matemática, pelas palavras de apreço e de motivação.

Obrigado ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, com destaque para o Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte, pelo interesse demonstrado no meu trabalho e pela disponibilização de todos os meios necessários para o realizar. Agradeço à fantástica equipa de profissionais que compõe o referido Serviço pelo espírito de camaradagem, por me receber e integrar no seu seio como um igual, e pelo excelente ano que me proporcionaram.

Agradeço aos amigos e parceiros em várias batalhas, Sérgio, Ricardo, Nuno, Lígia, Vanessa, Cátia, Sara, pelo incentivo, pelos momentos de distração e boa disposição e, até, por me terem aconselhado a mudar de ares.

Ao Miguel, pela companhia nas corridas à beira-rio ou no sem-fim de voltas à pista, e pelo companheirismo.

Ao Camilo, pela nova cultura e pelo espírito de descoberta.

Ao meu treinador e querido amigo Zé Eduardo, pela amizade, por me acolher e por promover a ovelha que há mim dentro daquele rebanho, entenda-se grupo de atletas.

À minha família, por todas as oportunidades que me proporcionou, tudo aquilo me ensinou e todo o apoio que desde sempre tenho recebido.

A todos, muito obrigado!



## palavras-chave

toxicologia forense, inseticidas organofosforados, GC-MS, GC-ECD, SPE.

## resumo

Os pesticidas são substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar pragas. No entanto, estes produtos são também responsáveis por intoxicações em seres humanos. Em Portugal, mais de metade das intoxicações voluntárias com pesticidas envolvem inseticidas organofosforados (IOFs).

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver e validar um conjunto de metodologias para a determinação analítica de dez IOFs, nomeadamente, clorfenvinfos, clorpirifos, diazinão, dimetoato, fentião, fosalone, malatión, paratión, pirimifos-metilo e quinalfos, em amostras de sangue total e de conteúdo gástrico, tendo em vista a introdução das mesmas na rotina pericial do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (STF-N).

Foram testados métodos de extração de IOFs com Extração em Fase Sólida (SPE) em amostras de sangue com colunas Oasis<sup>®</sup> HLB e Sep-Pak<sup>®</sup> C18 e com separação e deteção por GC-ECD e GC-MS. O método de extração com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> C18 foi selecionado, uma vez que no final do processo de extração e análise foram gerados sinais cinco vezes superiores aos obtidos após extração com as outras colunas de SPE, e mostrou ser seletivo para isolamento dos analitos e do padrão interno (etião) em amostras de sangue *postmortem*. Foram preparadas curvas de calibração entre 50 e 5000 ng/mL, utilizando modelos de regressão linear ponderada. Devido à sensibilidade mais baixa do detetor, não foi possível definir uma gama de trabalho para o fentião por GC-ECD, enquanto para o pirimifos-metilo esta foi estabelecida entre 500 e 5000 ng/mL. O limite de quantificação foi 50 ng/mL para todos os analitos, à exceção do pirimifos-metilo por GC-ECD (500 ng/mL). A eficiência de extração média situou-se entre os 72 e os 102%.

Após testes com Extração Líquido-Líquido (LLE) e/ou SPE, o procedimento adotado para rastreio/confirmação qualitativa de IOFs em amostras de conteúdo gástrico, consistiu num passo de LLE com éter dietílico, evaporação do solvente e retoma do extrato em acetonitrilo, seguido de SPE com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> C18 e da análise por GC-MS ou por GC-ECD. Obtiveram-se eficiências de extração médias entre 40 e 50% e limites de deteção de 10 µg/mL para todos os IOFs, exceto para o fentião por GC-ECD.

Os métodos desenvolvidos foram considerados robustos e adequados ao propósito, tendo sido já adotados na rotina do laboratório do STF-N.



**keywords**

forensic toxicology, organophosphorus insecticides, GC-MS, GC-ECD, SPE.

**abstract**

Pesticides are substances intended to prevent, destroy and control plagues. However, these products are also responsible for intoxications in humans. In Portugal, more than half of pesticide intoxications involve organophosphorus insecticides (OPs).

In this thesis we intended to develop and validate methodologies for the determination of ten OPs, namely, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, diazinon, dimethoate, fenthion, phosalone, malathion, parathion, pyrimiphos-methyl and quinalphos, in whole blood and gastric content samples, aimed at being included in routine procedures of Forensic Toxicology Laboratory of North Delegation of National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences (FTL-N).

In blood, were tested three procedures of Solid Phase Extraction (SPE) for OPs with Oasis<sup>®</sup> HLB and Sep-Pak<sup>®</sup> C18 cartridges, followed by GC-ECD and GC-MS analysis. The Sep-Pak<sup>®</sup> C18 cartridges extraction procedure was selected because the samples prepared using that SPE cartridges generated signals 5 times higher than those obtained with the two different Oasis<sup>®</sup> HLB cartridges. The method was shown to be selective for the isolation of selected OPs as well as the internal standard (ethion) in postmortem blood samples. Calibration curves Were prepared between 50 and 5000 ng/mL using weighted linear regression models. Due to the lower sensitivity of the detector it was not possible to establish a working range for fenthion by GC-ECD, whereas for pirimiphos-methyl it was set between 500 and 5000 ng/mL. The limit of quantification was 50 ng/mL for all analytes, except for pirimiphos-methyl by GC-ECD analysis (500 ng/mL). The average extraction efficiency was obtained between 72 and 102%.

After tests with Liquid-Liquid Extraction (LLE) and/or SPE, the procedure adopted for detection and qualitative confirmation of OPs in gastric content samples consisted in LLE with diethyl ether, solvent evaporation, recovery of the extract with acetonitrile, and SPE with Sep-Pak<sup>®</sup> C18 cartridges, followed by GC-ECD and GC-MS analysis. Average extraction efficiencies 40 and 50%, and detection limits of 10 µg/mL were obtained by GC-ECD, except for fenthion.

The developed methods were considered robust and fit for the purpose, and were already adopted in routine analysis of FTL-N.



# Índice

Índice.....	i
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Figuras .....	vii
Lista de Siglas .....	ix
1     Introdução.....	1
1.1     Toxicologia .....	1
1.1.1     Toxicologia Forense .....	2
1.1.2     A Intoxicação .....	3
1.1.3     Toxicocinética .....	4
1.2     Pesticidas .....	9
1.3     Os compostos a estudar na presente Tese .....	13
1.3.1     Inseticidas.....	15
1.3.2     Inseticidas Organofosforados .....	17
1.3.3     Mecanismo de Ação e Toxicidade dos Inseticidas Organofosforados...	20
1.3.4     Toxicocinética dos Inseticidas Organofosforados .....	22
1.3.5     Análise de Inseticidas Organofosforados .....	24
1.4     Validação de ensaios.....	42
1.4.1     Seletividade .....	43
1.4.2     Gama de trabalho .....	43
1.4.3     Limiares Analíticos .....	43
1.4.4     Arrastamento .....	44
1.4.5     Eficiência de Extração.....	44

1.4.6	Exatidão.....	44
1.4.7	Robustez.....	47
2	Objetivos do trabalho .....	49
3	Material e Métodos.....	51
3.1	Material.....	51
3.2	Equipamento .....	52
3.3	Preparação de Soluções .....	53
3.4	Desenvolvimento do Procedimento de Extração em Sangue .....	54
3.5	Desenvolvimento do Procedimento de Extração em Conteúdo Gástrico ..	56
3.6	Validação do Procedimento de Ensaio em Sangue.....	58
4	Resultados e Discussão .....	59
4.1	Identificação dos Compostos .....	59
4.1.1	Deteção por Espectrometria de Massa.....	59
4.1.2	Deteção de Captura Eletrónica.....	60
4.2	Desenvolvimento do Procedimento de Extração em Sangue .....	62
4.3	Desenvolvimento do Procedimento de Extração em Conteúdo Gástrico ..	64
4.4	Validação dos Procedimentos de Ensaios.....	67
4.4.1	Seletividade e Confirmação da Identidade.....	67
4.4.2	Gama de Trabalho e Linearidade .....	72
4.4.3	Limiares Analíticos .....	77
4.4.4	Arrastamento .....	80
4.4.5	Eficiência de Extração.....	81
4.4.6	Exatidão.....	82
4.4.7	Robustez.....	93
5	Conclusões .....	95
6	Referências .....	99



Anexos .....	111
Anexo A – Espectros de Massa em modo SCAN.....	111
Anexo B – Estudo da Homocedasticidade em GC-ECD em gamas de trabalho mais curtas .....	115
Anexo C – Regressão Linear Ponderada: Parâmetros das curvas de calibração..	116
Anexo D – Resultados das Séries para o estudo da Exatidão .....	119



## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação do risco dos pesticidas pela OMS.....	12
Tabela 2 – Os inseticidas organofosforados estudados neste trabalho .....	19
Tabela 3 – Procedimentos analíticos para determinação de inseticidas organofosforados em amostras biológicas humanas .....	35
Tabela 4 – Abundâncias relativas (%) dos íons-fragmento do grupo fosforado dos inseticidas em estudo .....	40
Tabela 5 – Os produtos químicos utilizados em laboratório .....	51
Tabela 6 – Condições usadas em GC-ECD .....	52
Tabela 7 – Condições usadas em GC-MS .....	53
Tabela 8 – Tempos de retenção, tempos de retenção relativos e íons selecionados dos inseticidas obtidos em GC-MS .....	60
Tabela 9 – Tempos de retenção e tempos de retenção relativos dos inseticidas obtidos em GC-ECD .....	60
Tabela 10 – Parâmetros de validação em função do propósito de método.....	67
Tabela 11 – Intervalos de tolerância das variações para as intensidades relativas dos íons em GC-MS .....	70
Tabela 12 – Valores de coeficiente de variação de $A_A/A_{PI}$ obtido em amostras para sangue .....	71
Tabela 13 – Valores de variância e do teste PG obtidos no estudo da homocedasticidade.....	73
Tabela 14 – Valores dos coeficientes de variação de $A_A/A_{PI}$ nos limites da gama de trabalho .....	74
Tabela 15 – Valores das somas dos erros relativos percentuais obtidos com os vários fatores de ponderação .....	76
Tabela 16 – Limites de Detecção e Limites de Quantificação obtidos em amostras de sangue .....	78
Tabela 17 – Coeficientes de variação no Limite de Quantificação em amostras de sangue e de conteúdo gástrico .....	79
Tabela 18 – Resultados da Eficiência da Extração obtidos .....	81

Tabela 19 – Cálculo das estimativas da precisão dos resultados.....	83
Tabela 20 – Estudo da precisão dos resultados por GC-MS-SIM com três alíquotas de sangue .....	83
Tabela 21 – Estudo da precisão dos resultados por GC-ECD com três alíquotas de sangue .....	84
Tabela 22 – Estudo da precisão dos resultados por GC-MS-SIM com duas alíquotas de sangue .....	84
Tabela 23 – Estudo da precisão dos resultados por GC-ECD com duas alíquotas de sangue .....	85
Tabela 24 – Limites de repetibilidade dos resultados de cada composto com três e com duas alíquotas de sangue.....	85
Tabela 25 – Teste <i>t-student</i> aos coeficientes de variação em cada nível dos grupos de resultados .....	86
Tabela 26 – Incertezas-padrão relativas associadas à precisão dos resultados.....	88
Tabela 27 – Recuperações obtidas na análise das amostras de sangue .....	89
Tabela 28 – Incertezas-padrão associadas à veracidade dos resultados .....	90
Tabela 29 – Teste <i>t-student</i> para a incerteza-padrão associada à veracidade dos resultados.....	91
Tabela 30 – Incertezas-padrão relativas associadas à veracidade dos resultados.....	91
Tabela 31 – Incertezas-padrão combinadas e incertezas expandidas combinadas dos resultados.....	92
Tabela 32 – Incertezas-padrão expandidas combinadas associadas aos métodos .....	93

## Lista de Figuras

Figura 1 – Diagrama representativo da toxicocinética de substâncias .....	5
Figura 2 – Biotransformação do THC em 11-hidroxi-THC .....	7
Figura 3 – Estruturas do UDPGA e da SAM .....	8
Figura 4 – Biotransformação do ácido benzoico .....	8
Figura 5 – Os pesticidas citados na Classificação de risco dos pesticidas pela OMS .....	12
Figura 6 – Os inseticidas organofosforados estudados neste trabalho .....	15
Figura 7 – Exemplos de inseticidas organoclorados .....	16
Figura 8 – Exemplos de inseticidas carbamatos .....	17
Figura 9 – Exemplos de inseticidas piretroides .....	17
Figura 10 – Estruturas do ácido fosfórico (A), do ácido tiofosfórico (B) e dos IOFs (C)...	17
Figura 11 – Mecanismo de ação da acetilcolinesterase na presença de (A) acetilcolina e de (B) fosfatos.....	20
Figura 12 – A estrutura do sarin e do tabun .....	22
Figura 13 – Biotransformação do clorpirifos .....	23
Figura 14 – Alquilfosfatos comuns resultantes da biotransformação de IOFs.....	24
Figura 15 – Estruturas do diclorvos (A) e do clorpirifos-metilo (B).....	27
Figura 16 – Fases sólidas usadas em SPE constituídas por partículas de sílica funcionalizadas com grupos octadecilsilano (A) e por uma matriz polimérica Oasis <sup>®</sup> HLB (B).....	29
Figura 17 – Procedimento normal de Extração em Fase Sólida.....	30
Figura 18 – Esquema de uma seringa de SPME.....	31
Figura 19 – Esquema representativo de um procedimento QuEChERS .....	33
Figura 20 – Detetor de Captura Eletrónica.....	37
Figura 21 – Diagrama representativo de um espectrómetro de massa .....	37
Figura 22 – Espectrómetro de massa equipado com analisador quadrupolar .....	38
Figura 23 – Padrão geral de fragmentação dos grupos dimetilfosfato e dimetiltiofosfato .....	39
Figura 24 – Padrão geral de fragmentação dos grupos dietilfosfato e dietiltiofosfato .....	40
Figura 25 – Padrão de fragmentação do clorfenvinfos.....	41
Figura 26 – Espectro de massa do clorfenvinfos.....	42

Figura 27 – Relação entre Exatidão, Precisão e Veracidade (adaptada a partir de [148]) ..	45
Figura 28 – Os vários níveis de precisão e alguns dos seus parâmetros (reproduzida a partir de [137]).....	46
Figura 29 – Cromatograma TIC de GC-MS-SCAN de uma mistura dos inseticidas estudados .....	59
Figura 30 – Cromatogramas de soluções-padrão de fentião de diferentes concentrações ..	61
Figura 31 – Cromatograma de GC-ECD de uma mistura dos compostos organofosforados em estudo.....	61
Figura 32 – Relação entre as áreas obtidas em GC-ECD das amostras fortificadas preparadas com os procedimentos <i>HLB_Raposo</i> , <i>HLB_Park</i> e <i>Sep-Pak_10</i> .....	62
Figura 33 – Relação entre as áreas obtidas em GC-ECD das amostras fortificadas preparadas com os procedimentos <i>Sep-Pak_10</i> , <i>Sep-Pak_5</i> e <i>Sep-Pak_2</i> .....	63
Figura 34 – Cromatogramas dos iões m/z 87 (A) e 93 (B) de amostras fortificadas e não fortificadas preparadas com o procedimento <i>LLE</i> (GC-MS-SIM) .....	65
Figura 35 – Cromatogramas dos iões m/z 87 (A) e 93 (B) de amostras fortificadas e não fortificadas, preparadas com <i>LLE_ACN_SPE</i> (GC-MS-SIM).....	66
Figura 36 – Cromatogramas dos eluatos_1 e eluatos_2 de amostras preparadas com o procedimento <i>LLE_ACN_SPE</i> (GC-ECD) .....	66
Figura 37 – Cromatogramas de uma amostra não fortificada de sangue ( <i>Sel_neg_10</i> ) e uma amostra fortificada ( <i>Sel_pos_10</i> ) por GC-ECD: Vista completa dos cromatogramas (A) e Aproximação (B) .....	68
Figura 38 – Excerto da folha de confirmação da identidade dos diferentes inseticidas em amostras de sangue por GC-ECD .....	69
Figura 39 – Excerto da folha de confirmação da identidade da fosalone numa amostra de sangue por GC-MS-SIM.....	70

## Lista de Siglas

$\eta$  – Eficiência de Extração

ACE – Acetilcolinesterase

CL<sub>50</sub> – Concentração letal 50%

CV – Coeficiente de Variação

DDT – Diclorofenil-2,2,2-tricloroetano

DEDTP – Dietilditiofosfato

DEP – Dietilfosfato

DETP – Dietiltiofosfato

DGADR – Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural

DGPC – Direcção-Geral de Protecção das Culturas

DL<sub>50</sub> – Dose letal 50%

DMDTP – Dimetilditiofosfato

DMP – Dimetilfosfato

DMTP – Dimetiltiofosfato

EI – Impacto Eletrónico

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

ECD – Detetor de Captura Eletrónica

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

GC – Cromatografia Gasosa

GC-ECD – Cromatografia Gasosa acoplada à Deteção de Captura Eletrónica

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa

GC-MS-SIM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa com Monitorização de Iões Seleccionados

HLB – Balanço Hidrofílico-Lipofílico

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMLCF, I.P. – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público

IOF – Inseticida Organofosforado

$K_{ow}$  – Coeficiente de partição octanol-água

LC – Cromatografia Líquida

LD – Limite de Detecção

LLE – Extração Líquido-Líquido

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LQ – Limite de Quantificação

$m$  – Massa

MS – Espectrometria de Massa

MRC – Materiais de Referência Certificados

$m/z$  – Razão massa / carga

NOAEL – *No observable adverse effect level*, ou, *nível sem efeitos adversos observáveis*

OMS – Organização Mundial de Saúde

$rf$  – radiofrequência

rpm – Rotações por minuto

SAM – S-adenosilmetionina

SIM – Monitorização de Iões Seleccionados

SPE – Extração em Fase Sólida

STF-N – Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do INMLCF, I.P.

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, ou, *Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro*

TIC – Corrente Iónica Total

TCP – 3,5,6-tricloro-2-piridinol



THC – Tetra-hidrocanabinol

t.r. – Tempo de retenção

t.r.r. – Tempo de retenção relativo

UDPGA – Ácido uridinodifosfatoglucurónico

z – Carga



# 1 Introdução

## 1.1 Toxicologia

O ser humano vive rodeado e, por isso, exposto a inúmeras substâncias. Uma parte destas é de origem natural e a outra resulta da atividade humana. O termo xenobiótico procura englobar todos os compostos que são estranhos a um dado organismo, embora por vezes lhe seja atribuído um significado mais amplo, de modo a abranger compostos que existem naturalmente num organismo mas são administrados ou estejam em concentrações fora do comum [1].

De acordo com Paracelso (1493-1541), “todas as substâncias são veneno: não há nenhuma que não o seja. Só a dose distingue um veneno de um remédio”. Paracelso, cujo nome verdadeiro era Theophrastus Phillipus Auroleus Bombastus von Hohenheim, rompeu com o Passado, onde o agente tóxico era visto como um preparado ou mistura e onde a Humanidade procurava os venenos animais e extratos vegetais para usar na caça, em homicídios e em guerras [2]. Paracelso classificou o agente tóxico como sendo uma entidade química, cuja dose (dependente de fatores como o nível e a duração de exposição e a taxa de absorção [3]) determina se produz efeitos negativos ou benéficos, ou se é inócuo. Por tudo isto, Paracelso é considerado por alguns autores o pai da Toxicologia [2]. São também encontradas referências à importância de Mateo Buenaventura Orfila (1787-1853), que com a publicação do livro *Traité des poisons tirés des règnes minéral végétal et animal, ou Toxicologie générale, considérée sous les rapports de la physiologie, de la pathologie et de la médecine légale*, em 1813, lançou as bases da Toxicologia Moderna [4], nomeadamente, definindo a Toxicologia como uma ciência que lida com substâncias tóxicas, os seus efeitos, as probabilidades de surgimento desses efeitos e a sua determinação analítica. Nesse trabalho, Orfila abordou vários aspetos da toxicologia reconhecidos como válidos nos dias de hoje, como por exemplo a relação entre um xenobiótico e os sintomas evidenciados [5].

Desde os tempos de Paracelso, passando pela época de Orfila, até à atualidade, muita coisa mudou. Os avanços ao nível das técnicas e dos equipamentos analíticos permitiram

determinar substâncias tóxicas e seus metabolitos a níveis cada vez mais baixos, trazendo, com isso, benefício para a Ciência em geral e para a Toxicologia em particular.

### 1.1.1 Toxicologia Forense

Dada a enorme variedade de substâncias tóxicas e dos seus efeitos, a Toxicologia é uma ciência muito ampla. Existem inúmeras áreas, todas elas interligadas e interdisciplinares, podendo destacar-se a *Toxicologia Forense*, no âmbito da qual este trabalho se insere. A Toxicologia Forense trabalha na interface entre os aspetos médicos e legais da Toxicologia, baseia-se em conhecimentos de Toxicologia Analítica e visa a resolução de questões judiciais [6].

Em Portugal, a Toxicologia Forense teve o contributo muito importante de António Augusto da Costa Simões (1819-1903) e do seu condiscípulo e amigo José Ferreira de Macedo Pinto (1814-1895) na segunda metade do século XIX. Costa Simões levou a cabo várias investigações forenses e estudos que publicou na revista *O Instituto*, enquanto Macedo Pinto publicou em 1860 a obra *Toxicologia judicial e legislativa* onde enfatizava a importância dos exames toxicológicos e os enquadrava na moldura legislativa vigente [7].

Atualmente, a Toxicologia Forense encontra-se inserida no Serviço de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público, abreviadamente designado por INMLCF, I.P., um instituto público integrado na administração indireta do Estado, sob a alçada do Ministério da Justiça, conforme a Lei Orgânica do Ministério da Justiça publicada no *Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de Julho*. Apesar da evidente ligação à Medicina Legal, frequentemente associada à morte, a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos a seu cargo não incide somente sobre o cadáver, mas também sobre o indivíduo vivo. De um modo geral, o toxicologista forense está envolvido em situações de [4]:

- investigação toxicológica, para determinar a causa de morte ou investigar a intoxicação ilícita por uma terceira parte (por exemplo, com drogas de abuso);
- teste da performance humana, para investigar incidentes decorrentes de condução sob o efeito do álcool ou drogas, ou detetar o uso de drogas que melhorem o desempenho desportivo;

- teste ao consumo de drogas, para detetar situações de incumprimento de políticas sobre o uso de determinadas substâncias no local de trabalho ou evidenciar a reabilitação total após um histórico de dependência.

O envolvimento em processos judiciais acarreta um acréscimo de cuidados e responsabilidade ao longo das diferentes etapas por que passa a amostra, como a recolha, a preparação e a análise [8], pois um qualquer ator judicial pode questionar a experiência e os conhecimentos do toxicologista forense, pedir a descrição detalhada dos procedimentos analíticos seguidos ou colocar em causa a validade de qualquer opinião [4].

### 1.1.2 A Intoxicação

A intoxicação é um estado resultante da exposição a uma substância tóxica, e é geralmente dividida em três tipos. Abaixo, além dos três tipos de intoxicações apresentam-se alguns conceitos relacionados:

- *Intoxicação aguda*, que resulta de um ou vários episódios de contacto com o agente tóxico num curto período de tempo (nunca superior a 24 horas). O agente é rapidamente absorvido e produz imediatamente efeitos tóxicos, podendo levar à morte ou recuperação também num curto intervalo de tempo [9, 10]. É normalmente avaliada pela Dose Letal 50%, ou simplesmente Dose Letal ( $DL_{50}$ ), a dose individual necessária para matar metade dos organismos expostos experimentalmente (de um modo geral, os testes de avaliação da toxicidade usam o rato como organismo de estudo após administração oral ou dérmica) e é expressa como a massa do composto tóxico por unidade de massa corporal ( $mg\ kg^{-1}$ ) [9]. Se for necessário verificar a toxicidade por inalação, usa-se um parâmetro análogo, a Concentração Letal 50%, ou simplesmente Concentração Letal ( $CL_{50}$ ,  $mg\ L^{-1}$ ) no ar após a exposição por um período de 4 horas. Contudo,  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  são limitados no seu significado pois a extrapolação para humanos está rodeada de incerteza. Valores muito elevados ou muito baixos de  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$ , em conjunto com dados recolhidos de situações reais bem detalhadas em humanos, apenas permitem ter noção da segurança/toxicidade do agente tóxico [9].

- *Intoxicação subaguda* ou *subcrónica*, onde, fruto de exposições frequentes ou regulares à substância tóxica, as manifestações clínicas surgem após intervalos de tempo ligeiramente aumentados [9]. Apesar de em animais haver distinção dos dois termos (subaguda para exposições repetidas por períodos inferiores a 1 mês e subcrónica em intervalos de 1 a 3 meses), em humanos é comum a utilização indistinta destes devido à dificuldade em definir claramente a duração e a frequência de exposição [10] .
- *Intoxicação crónica*, como consequência da exposição repetida à substância tóxica durante um longo período (meses, anos, ou mesmo décadas). É medida por parâmetros como o *NOAEL* (da expressão inglesa ‘*no observable adverse effect level*’ – nível sem efeitos adversos observáveis) e a Ingestão Diária Aceitável (IDA). O primeiro corresponde à quantidade a que um animal (em testes com duração de pelo menos 90 dias) pode ser exposto ao longo da vida sem sofrer quaisquer efeitos perniciosos. O segundo é o análogo para humanos. Ambos são expressos em massa de agente tóxico por peso corporal e por dia ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ). A IDA, que pode ser considerado um parâmetro essencialmente teórico, é estimada a partir da divisão do NOAEL (determinado experimentalmente) por um fator de incerteza, normalmente 100, para explicar as diferenças entre os animais dos ensaios laboratoriais e os humanos e as possíveis diferenças de sensibilidade entre os seres humanos. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) usa o conceito de ‘dose de referência’ em detrimento da IDA de modo a evitar a ideia de que qualquer exposição a uma substância tóxica é aceitável [11].

### 1.1.3 Toxicocinética

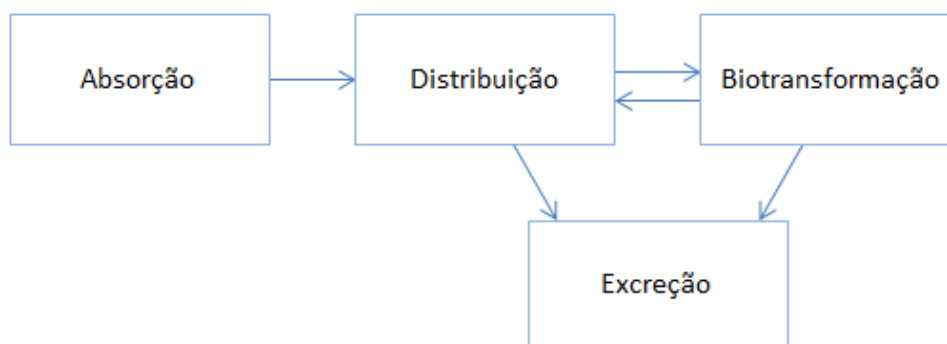
A toxicidade de qualquer agente químico, além de dependente da dose, depende também de fatores quer relativos ao organismo alvo da agressão, como a idade, o sexo, a espécie, o estado de saúde, o estado reprodutor, a via de exposição, a capacidade de biotransformação e a eliminação, quer relativos ao próprio agente, como o estado físico, a volatilidade e a reatividade [3].

O conhecimento da sequência de processos envolvendo o composto tóxico em toda a sua extensão, designada *Farmacocinética*, é essencial para possibilitar a compreensão

informada da ação da substância em questão. A sua aplicação na toxicologia é referida como Toxicocinética e consiste nas seguintes etapas [3]:

- absorção;
- distribuição;
- biotransformação;
- eliminação.

O conjunto de processos pode ser esquematizado como disposto na Figura 1 [8]. Estes passos podem ocorrer simultaneamente, estão interrelacionados e, por isso, influenciam-se mutuamente. Por exemplo, a taxa de excreção de um agente tóxico depende da sua distribuição e/ou biotransformação, ou se a substância é distribuída para o tecido adiposo e armazenada no mesmo. Aliás, a deposição de agentes tóxicos não só afeta a eliminação como também afeta a toxicidade [12]. Frequentemente a biotransformação e a excreção são agrupadas e referidas como eliminação, dado que funcionam conjuntamente para eliminar as substâncias tóxicas [13].



**Figura 1 – Diagrama representativo da toxicocinética de substâncias**

### ***Absorção de xenobióticos***

A fase de absorção compreende a entrada da substância no organismo, desde o local de absorção até à circulação sistémica [12]. A velocidade e a extensão com que ocorre dependem das vias de exposição: ingestão, inalação, injeção (intramuscular, intravenosa, subcutânea) e dérmica [3]. A absorção ocorre mais rapidamente após a injeção intravascular. Neste caso, o composto tóxico é absorvido de imediato e atinge nesse momento um valor máximo da concentração na corrente sanguínea [13], enquanto a absorção por exposição dérmica é a mais lenta e, assim, é necessário um período maior até atingir o máximo de concentração, devido à necessidade de o composto atravessar, por

difusão passiva, as diferentes camadas da pele até atingir a circulação sanguínea. A epiderme, ou mais concretamente a camada córnea (a mais exterior), é a principal barreira limitadora da taxa de absorção [12]. No que respeita à extensão, o composto tóxico é totalmente absorvido na já referida injeção intravenosa, enquanto a absorção no estômago de alguns compostos que se encontram não-ionizados a pH estomacal, como a aspirina (ácido acetilsalicílico), ocorre numa pequena extensão [13].

Um outro fenómeno a ter em conta é a reabsorção. Os agentes tóxicos e os produtos da sua degradação presentes no fígado são normalmente excretados através da bÍlis, que é libertada no jejuno (sito na parte inicial do intestino delgado, entre o duodeno e o Íleo). Se os compostos forem suficientemente lipofÍlicos, estes podem ser reabsorvidos. Caso contrário, são eliminados através das fezes. O ciclo envolvendo a passagem pelo fígado (com ou sem biotransformação), a excreção biliar e a reabsorção é conhecido como a circulação entero-hepática e pode ocorrer várias vezes até que todo o agente tóxico seja completamente eliminado do organismo [12, 13].

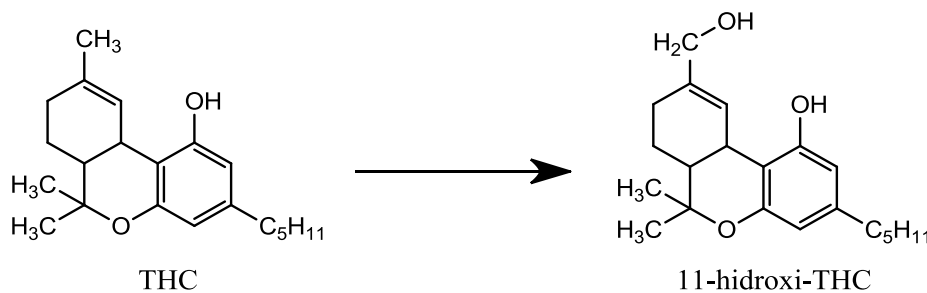
### ***Distribuição de xenobióticos***

A distribuição pode ser dividida em duas fases. Na primeira, após atingir a corrente sanguínea, o agente tóxico, que pode ter um efeito sistémico ou localizado, é rapidamente distribuído através de todo o organismo [8]. Numa fase posterior, dá-se a distribuição do agente tóxico do sangue para os tecidos, o que se traduz num decréscimo da concentração de xenobiótico no plasma sanguíneo. De um modo geral, a fase inicial da distribuição é dominada pelo fluxo sanguíneo, enquanto a segunda fase depende de inúmeros fatores: do coeficiente de partição entre o sangue e o tecido, do grau de ionização, da dimensão da molécula, da ligação a proteínas do plasma, dos transportes facilitado e ativo para o interior ou exterior das células e da porosidade dos capilares [12, 13]. Por exemplo, os compostos hidrófilos e os iões têm bastante dificuldade em entrar nas células, exceto por transporte membranar, devido à elevada esfera de hidratação que os rodeia. Por outro lado, os xenobióticos lipossolúveis, isto é, com um elevado coeficiente de partição entre lípidos e água, movem-se rapidamente por difusão através da bicamada fosfolipídica da membrana celular [12].



### ***Biotransformação de xenobióticos***

A biotransformação de xenobióticos é também designada por metabolismo. Sendo a lipossolubilidade um fator importante na absorção de xenobióticos é, por isso, também importante na eliminação. Assim, a transformação do agente tóxico em compostos mais polares e, por conseguinte, mais hidrófilos, é importante de modo a torná-los mais adequados para a excreção através da urina ou das fezes [14]. Contudo, a transformação não implica que os compostos resultantes sejam menos tóxicos. Os produtos podem ser mais tóxicos do que os compostos que estiveram na sua origem. Por exemplo, o constituinte principal da canábis, o trans- $\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol (THC), quando é hidroxilado, dá origem à forma 11-hidroxi-tetra-hidrocanabinol (11-hidroxi-THC, Figura 2), passando a ter, comparativamente, uma ação muito mais tóxica [13].



**Figura 2 – Biotransformação do THC em 11-hidroxi-THC**

O fígado é o principal local onde ocorre a biotransformação de xenobióticos, embora possa ocorrer também no trato gastrointestinal, rins e pulmões [13, 14].

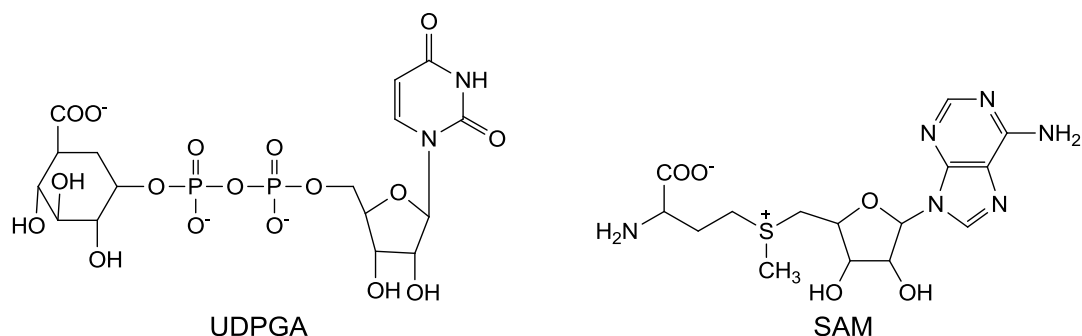
A biotransformação de xenobióticos pode ser dividida em duas fases:

- Fase I: reações de oxidação, redução e hidrólise do composto;
- Fase II: reações de conjugação.

Na Fase I, são expostos ou adicionados grupos funcionais como  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$  ou  $-COOH$ , com intervenção de enzimas tais como: oxidases (em reações de dessulfuração, N- e O-desalquilação, desarilação e tio-oxidação), redutases (em reações de redução de grupos nitro de anéis aromáticos e de desalogenação), hidrolases (em reações de hidrólise). Estas transformações resultam normalmente num pequeno aumento da hidrofília [14]. O sistema do Citocromo P450 é visto como o principal complexo enzimático em termos de versatilidade catalítica e do número de xenobióticos biotransformados durante a Fase I. As

enzimas do Citocromo P450 encontram-se essencialmente no retículo endoplasmático hepático, embora possam virtualmente estar em todos os tecidos.

Na Fase II, o composto ou os seus metabolitos são ligados através de diversos grupos funcionais (amino, carboxilo, hidroxilo, entre outros) a substratos endógenos, a partir dos denominados cofatores como, por exemplo, o ácido uridino difosfatoglucurónico (UDPGA) ou a S-adenosilmetionina (SAM), apresentados na Figura 3 [13, 14].

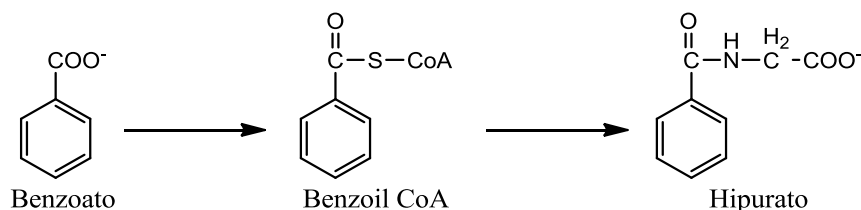


**Figura 3 – Estruturas do UDPGA e da SAM**

Da adição do substrato resulta um aumento significativo da hidrofília do composto, de modo a facilitar a posterior eliminação do xenobiótico [6]. Esta Fase, que pode ou não ser precedida pela Fase I [14], inclui reações de:

- glucuronização (de álcoois alifáticos, fenóis, amins alifáticas e aromáticas e grupos sulfidrílo livres);
- sulfonação (de fenóis e de álcoois alifáticos, como o naftol e o etanol);
- acetilação (de amins aromáticas e hidrazinas (R-NH-NH<sub>2</sub>));
- metilação (de fenóis, catecóis, amins aromáticas e alifáticas);
- conjugação com aminoácidos, tais como a glicina.

A título de exemplo, é apresentada na Figura 4 a reação de conjugação do ácido benzoico com a glicina, resultando o ácido hipúrico. Curiosamente, esta foi a primeira reação de biotransformação descrita [14].



**Figura 4 – Biotransformação do ácido benzoico**

### ***Excreção de xenobióticos***

Os compostos tóxicos e os seus metabolitos são eliminados do organismo por várias vias. O rim é possivelmente o órgão mais importante na excreção de substâncias, dado que a maioria é eliminada por via urinária. No entanto, tal como referido acima, muitos dos xenobióticos têm de ser convertidos metabolicamente em compostos hidrossolúveis antes de poderem ser excretados através da urina [12].

As fezes são a segunda via de excreção, e o ar expirado é a terceira, e a preferencial para substâncias voláteis. Todas as secreções corporais (tais como suor, saliva, lágrimas e leite) constituem potenciais modos de eliminação de xenobióticos [12].

## **1.2 Pesticidas**

Os pesticidas são definidos pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) como “qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies não desejadas de plantas ou animais causadores de danos ou de outra forma interferindo com a produção, o processamento, o armazenamento, o transporte ou a comercialização de alimentos, mercadorias agrícolas, madeira e produtos de madeira ou alimentos para animais, ou que possa ser administrada a animais para o controlo de insetos, aracnídeos ou outras pragas em seus corpos. O termo inclui ainda a ação como reguladores de crescimento, desfolhantes, dessecantes ou agentes de desbaste de frutos ou preventivos da queda prematura de frutos e substâncias aplicadas às culturas, para proteger os produtos contra a deterioração durante o armazenamento e transporte” [15].

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com os organismos-alvo (herbicidas para controlar ervas daninhas, bactericidas para bactérias, inseticidas para insetos, fungicidas para fungos, entre outros), com a origem (compostos orgânicos de síntese como os compostos organoclorados, compostos inorgânicos como o arsenito de cobre, e compostos naturais como a nicotina), com a estrutura química (organofosforados, carbamatos, piretroides, organoclorados, compostos heterocíclicos, fenóis substituídos), ou com as formulações (por exemplo, pós, granulados ou aerossóis) [16, 17].

Até aos anos 40 do século XX, os pesticidas eram essencialmente compostos inorgânicos (contendo metais pesados como, por exemplo, o arsénio, o chumbo e o

mercúrio) e alguns agentes naturais de origem vegetal (por exemplo, a nicotina e as piretrinas) [17, 18]. Por essa altura, com o aparecimento de pesticidas como o DDT (diclorofenil-2,2,2-tricloroetano), e até à década de 80, assistiu-se a um aumento exponencial da produção e utilização de pesticidas sintéticos, representando ainda nos dias de hoje uma atividade económica de grande importância. De acordo com dados da EPA [19-22], nos últimos 15 anos tem-se assistido a um decréscimo residual do consumo global de pesticidas, fruto do surgimento de leis que limitam a sua utilização e da consciencialização da população sobre o emprego destes.

O livro *Silent Spring*, de Rachel Carson, publicado em 1962, é considerado um marco na proteção ambiental, pois levantou preocupações na opinião pública sobre o uso e a segurança dos pesticidas e a poluição ambiental, tendo também contribuído para a proibição do DDT em 1972 nos Estados Unidos da América. Segundo dados da EPA, a despesa mundial com pesticidas em 2007 foi superior a 39,4 mil milhões de dólares. Estes valores corresponderam a 1,94 milhões de toneladas em substâncias ativas, onde aproximadamente 40% eram herbicidas, 17% inseticidas, 10% fungicidas, e os restantes 33% outros pesticidas [19]. Em Portugal, os dados apresentados pela Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) mostraram uma comercialização anual média superior a 16 mil toneladas de substâncias ativas no período entre 2001 e 2010, em que se destacaram os fungicidas (73,1%) e os herbicidas (12,6%) [23]. Também de acordo com esses dados, os inseticidas, o tipo de pesticidas no qual este trabalho se foca (os critérios na base da sua seleção e, em particular, dos inseticidas organofosforados, serão apresentados mais adiante), foram inseridos num grupo que compreendia também os acaricidas, o qual, nesse período, correspondeu a 2,8% dos pesticidas vendidos.

A utilização de pesticidas na Agricultura apresenta como vantagens a melhoria da produção e da qualidade de colheitas e o controlo de espécies invasoras [17]. No entanto, a dispersão e a acumulação dos pesticidas no ambiente, com a consequente contaminação dos lençóis freáticos, do ar e dos solos, afeta outros organismos além dos organismos-alvo e gera, por vezes irreversivelmente, desequilíbrios biológicos e ecológicos [17, 24]. Por exemplo, ao DDT, usado no controlo do mosquito transmissor da malária, além de ter um efeito desregulador do sistema endócrino, é atribuída a responsabilidade pela diminuição da espessura da casca de ovos, resultando em problemas reprodutivos e em morte de aves, e pelo comportamento maternal anormal de gaivotas-fêmeas [24, 25]. Apesar da sua baixa

toxicidade em mamíferos, existem evidências de que o DDT possa ser cancerígeno [26]. De um modo geral, os efeitos nefastos dos pesticidas no Homem variam desde uma simples irritação da pele ou dos olhos até à morte. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorrem anualmente cerca de 3 milhões de intoxicações com pesticidas, dentre as quais pelo menos 250 mil mortais [27]. Em linha com estes valores, Gunnell *et al.* estimaram que os pesticidas são utilizados em aproximadamente 1/3 dos mais de 800 mil suicídios anuais a nível mundial [28]. Num estudo que compreendeu os anos de 2000 a 2007, os pesticidas foram a segunda causa dos internamentos por intoxicação aguda, a seguir aos medicamentos, na região abrangida pelos Hospitais da Universidade de Coimbra [29]. O único grupo etário que contrariou esta tendência englobava as pessoas com mais de sessenta anos, o qual apresentava a maior incidência de intoxicações por pesticidas. Os pesticidas foram também os principais agentes tóxicos que estiveram na origem das intoxicações que se revelaram fatais.

Apesar de, atualmente, existirem derivados mais seguros dos pesticidas iniciais, ditos pesticidas de segunda e de terceira gerações estes não são isentos de um certo grau de toxicidade para os organismos vivos, e podem ser encontrados resíduos da sua aplicação em alimentos, em água subterrânea e no ar [18].

Com o objetivo de poder distinguir o grau de toxicidade dos pesticidas, em 1974 a OMS classificou os pesticidas em cinco grupos (Tabela 1). Esta classificação é baseada primariamente na toxicidade de acordo com os valores da  $DL_{50}$  oral em ratos, como exemplificado na tabela referida. A classificação, que depende também do facto de o pesticida ser um sólido ou um líquido, pode ser ajustada de acordo com o valor de  $DL_{50}$  dérmica ou com informações recolhidas a partir da observação direta de intoxicações [30]. Apesar de a extrapolação dos valores da  $DL_{50}$  para humanos estar rodeada de incerteza, por exemplo, Peter *et al.* [31] mostraram a existência de uma relação linear entre as classes da OMS e as consequências da intoxicação humana com pesticidas organofosforados. Nesse estudo, e num universo de 251 intoxicações, a taxa de mortalidade foi de 16,7%, 5,3% e 0% com os pesticidas das Classes I, II e III, respetivamente. Além disso, a necessidade de ventilação assistida foi superior nos casos de intoxicação com pesticidas da Classe I em comparação com os casos envolvendo pesticidas da Classe II.

Tabela 1 – Classificação do risco dos pesticidas pela OMS

Classe	Descrição	LD <sub>50</sub> oral (mg/kg massa corporal)		Exemplos (Figura 5)
		Sólidos	Líquidos	
Ia	Extremamente perigoso	< 5	< 20	Brodifacume (R)
Ib	Altamente perigoso	5 – 50	20 – 200	Formetanato (A)
II	Moderadamente perigoso	50 – 2000	200 – 2000	Paraquato (H)
III	Ligeiramente perigoso	> 2000	> 2000	Carboxina (F)
U	Pouco provável de causar intoxicação aguda	5000 ou superior		Niclosamida (M)

A – acaricida; F – fungicida; H – herbicida; M – moluscicida; R – rodenticida.

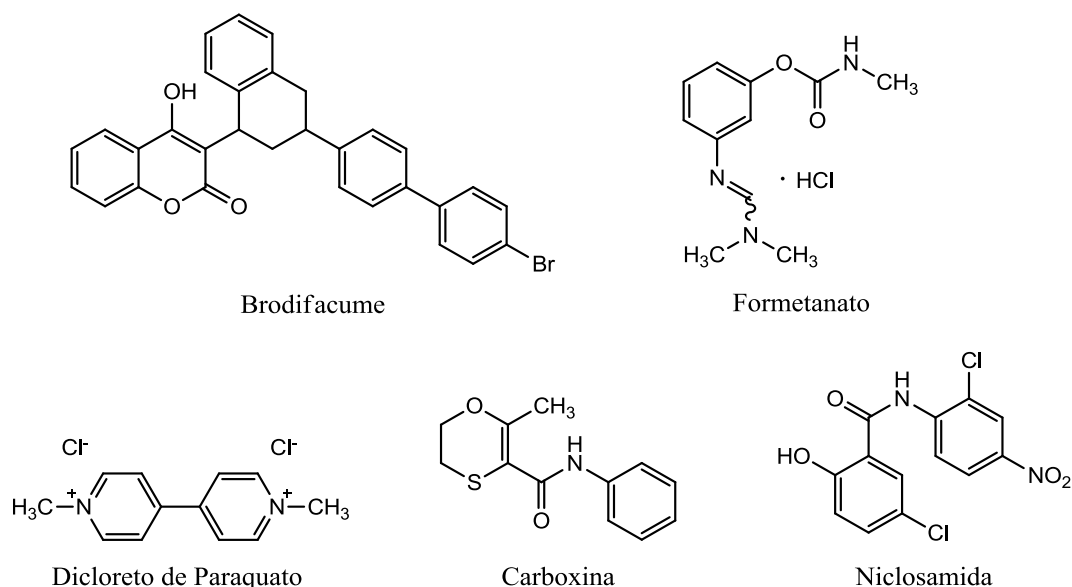


Figura 5 – Os pesticidas citados na Classificação de risco dos pesticidas pela OMS

Em Portugal, os pesticidas são essencialmente utilizados na agricultura. São denominados por produtos fitofarmacêuticos e compreendem as substâncias ativas e as preparações contendo uma ou mais substâncias ativas, ditas formulações. Por isso, de acordo com o *Decreto-Lei n.º 94/98, de 15 de Abril*, a comercialização de pesticidas só é permitida através de autorização de venda pela DGADR, na altura designada por Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC).

As substâncias ativas aceites pela Comissão Europeia, e que estão na base dos produtos fitofarmacêuticos, encontram-se dispostas na denominada *Lista Positiva Comunitária*, que consta do *Anexo I da Directiva n.º 91/414/CEE, do Conselho, de 15 de Julho*. Vários Decretos-Lei têm procedido à actualização das substâncias ativas constantes da *Lista Positiva Comunitária*, transpondo para a ordem jurídica interna diretivas

comunitárias que alteram o Anexo I da supracitada Directiva. O mais recente é o *Decreto-Lei n.º 80/2011, de 20 de Junho*.

Com o intuito de proteger o consumidor final da ingestão involuntária destes agentes tóxicos, o *Decreto-Lei n.º 39/2009, de 10 de Fevereiro*, estabelece os limites máximos de resíduos de pesticidas (LMR) como os limites legais de concentração de substâncias ativas, metabolitos e/ou produtos de degradação ou de reação de substâncias ativas, no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal. Os LMR são estimados para cada alimento e para cada pesticida tendo por base o possível consumo do alimento e o valor de Ingestão Diária Aceitável do pesticida.

### **1.3 Os compostos a estudar na presente Tese**

Este trabalho incidirá sobre o estudo de inseticidas organofosforados e foram vários os critérios que estiveram na base da decisão.

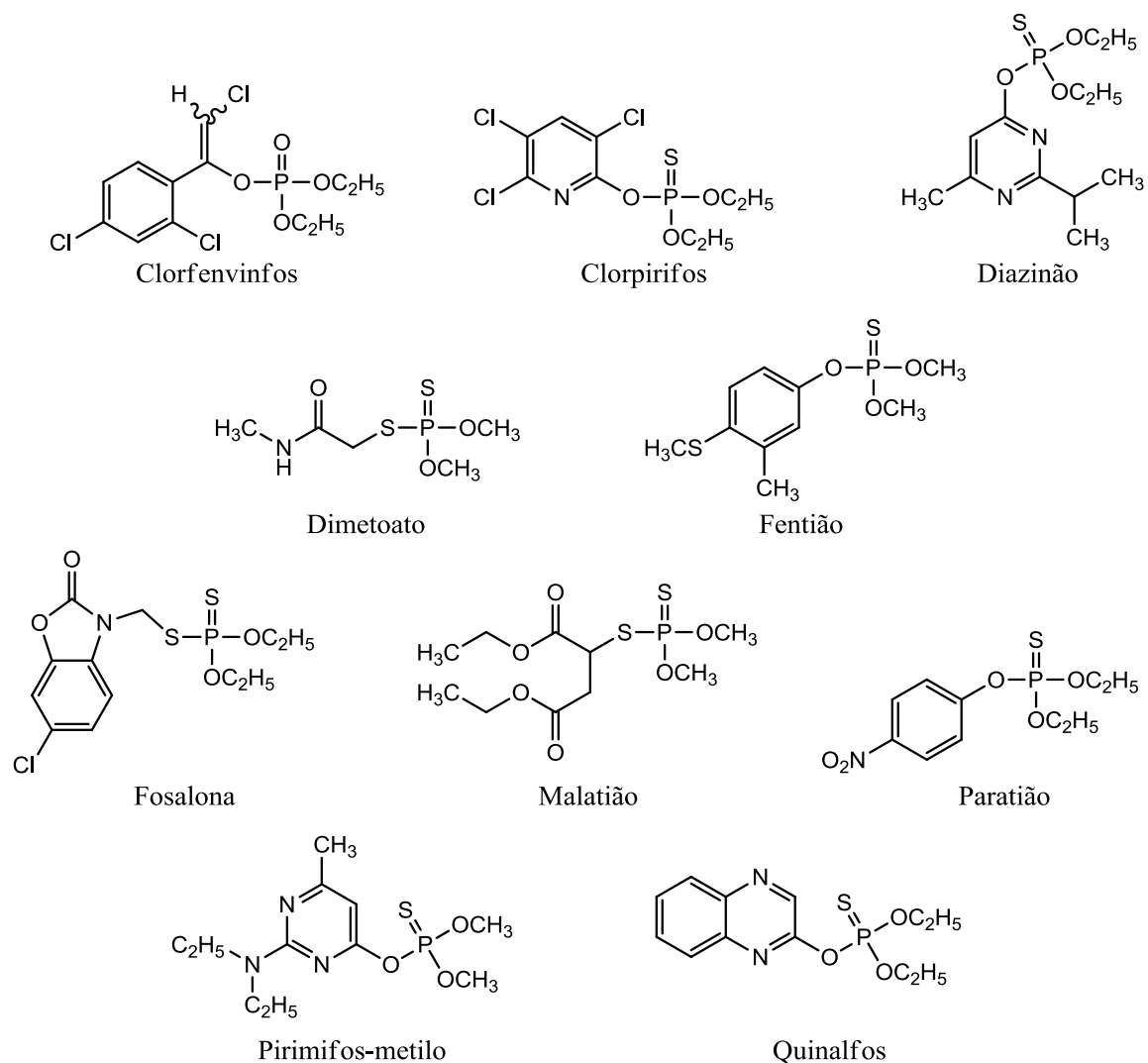
A opção pelos inseticidas em geral deveu-se, por um lado, ao facto de, apesar de não ser o grupo de pesticidas mais comercializado em Portugal (como referido acima), estes são agentes neurotóxicos quer para os organismos-alvo quer para os organismos não-alvo, como os humanos [18]. Por outro lado, os pesticidas mais comercializados (os herbicidas e os fungicidas) apresentam, com poucas exceções, uma toxicidade baixa para os mamíferos [18]. De facto, na classificação proposta pela OMS [26], nenhum pesticida com ação herbicida e/ou fungicida integrava a Classe Ia e apenas sete, entre 58, constavam na Classe Ib, enquanto os inseticidas correspondiam a quase 60% dos pesticidas inseridos nas duas Classes de maior risco.

Os inseticidas organofosforados (IOFs) são os mais utilizados como meio de intoxicação voluntária em termos de casuística do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do INMLCF, I.P. (STF-N), daí o estudo específico deste grupo no trabalho aqui apresentado. Os IOFs são também encontrados em casos de intoxicações com pesticidas na região centro e sul do país [32, 33]. Teixeira *et al.* verificaram que os IOFs corresponderam a 63% dos 111 resultados positivos num universo de 639 pedidos de análise [32]. O quinalfos (um IOF que será abordado mais à frente) foi o pesticida mais encontrado (em 32 ocasiões).

Um outro fator relevante na escolha dos IOFs é a comercialização destes compostos representar uma elevada quota de mercado, representando mais de 80% dos inseticidas vendidos nos anos de 2007 a 2010 em Portugal [23].

Posto isto, foi selecionado um conjunto de IOFs (apresentados na Figura 6), em torno dos quais o trabalho é desenvolvido, com base na toxicidade, na presença em casos de intoxicações e na comercialização. O clorfenvinfos e o paratião pertencem às classes Ib e Ia, respetivamente, na classificação do risco dos pesticidas da Organização Mundial de Saúde [30]. A presença de clorfenvinfos, de clorpirifos, de diazinão, de dimetoato, de fentião, de paratião e de quinalfos foi registada em análises realizadas nas delegações do Norte (dados não publicados), do Centro [32] e do Sul [33]. O pirimifos-metilo, em conjunto com o clorpirifos e o dimetoato, integra a lista de substâncias ativas atualmente permitidas para comercialização em Portugal [34]. Os restantes inseticidas já citados, a par da fosalone e do malatión, apesar de já não estarem disponíveis para venda e a sua utilização estar proibida, foram selecionados porque a sua interdição aconteceu nos últimos 10 anos, associada à prática comum de os pequenos agricultores e os utilizadores domésticos armazenarem e utilizarem pesticidas até ao fim do stock, independentemente da validade ou do limite legal de utilização. Aliás, a utilização da fosalone, do malatión e do diazinão foi permitida até muito recentemente (2008) [34].





**Figura 6 – Os inseticidas organofosforados estudados neste trabalho**

Nota: o Clorfenvinfos é encontrado na forma de dois isômeros geométricos (*Z* e *E*, em que *Z* corresponde a pelo menos 90% das preparações comerciais [35])

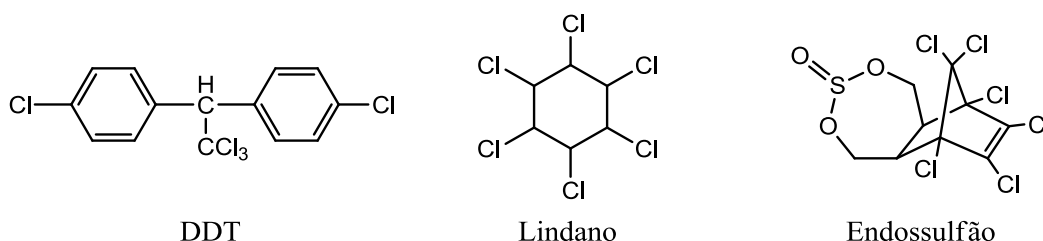
### 1.3.1 Inseticidas

Os inseticidas são usados contra insetos e ovos e larvas de insetos. Dentro dos inseticidas existem 4 grupos principais:

- organoclorados;
- carbamatos;
- piretroides;
- organofosforados.

### *Inseticidas Organoclorados*

Os compostos organoclorados, como o DDT, o lindano ou o endossulfão (Figura 7), entre outros, podem conter anéis aromáticos na sua estrutura e apresentam na sua constituição átomos de cloro em substituição de átomos de hidrogénio. Apresentam toxicidade nos mamíferos através da interferência na transmissão de impulsos nervosos. A toxicidade, a baixa volatilidade, a estabilidade química, a solubilidade nos lípidos, a biotransformação e a degradação lentas levaram a que fossem banidos, essencialmente, nos países ocidentais, e fossem substituídos pelos carbamatos e organofosforados [26]. Dados disponibilizados pela DGADR mostram que, em Portugal, a sua comercialização desceu progressivamente das 90 toneladas em 2001 para 0 em 2009 [23].



**Figura 7 – Exemplos de inseticidas organoclorados**

### *Inseticidas Carbamatos*

Os carbamatos são derivados de ácido carbâmico ( $\text{NH}_2\text{COOH}$ ), em que os grupos OH e  $\text{NH}_2$  se encontram funcionalizados, na forma de ésteres e amidas, respetivamente. Os 3 átomos de hidrogénio podem ser substituídos por grupos alquilo ou arilo [26]. Pertencem a este grupo, por exemplo, o carbofurão, o carbaril e o aldicarbe (Figura 8), que são atualmente proibidos em Portugal [34] devido à sua toxicidade (pertencem às classes da OMS Ia, Ib e II, respetivamente [30]). A toxicidade evidenciada deve-se ao efeito inibidor das acetilcolinesterases, à semelhança dos compostos organofosforados. Contudo, a inibição por ação dos carbamatos é reversível, ao contrário da inibição exercida pelos inseticidas organofosforados [26]. A importância e a inibição das acetilcolinesterases serão discutidas mais adiante. Em 2010, as vendas deste grupo de pesticidas corresponderam a 3,6% do total anual de inseticidas [23].

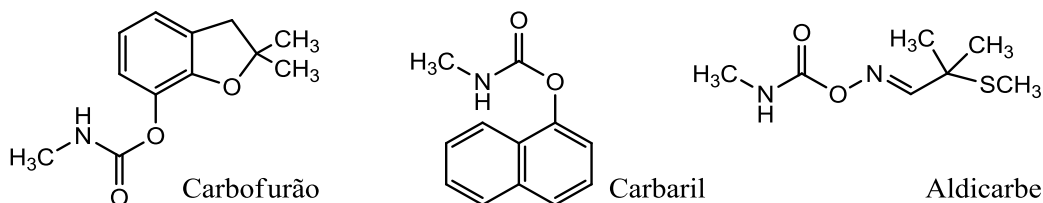


Figura 8 – Exemplos de inseticidas carbamatos

### *Inseticidas Piretroides*

Os inseticidas piretroides são inseticidas sintéticos similares às piretrinas naturais. As próprias piretrinas (por exemplo, a Piretrina I, representada na Figura 9), extraídas das flores de crisântemos, são usadas como inseticidas há mais de 2000 anos [26]. A toxicidade da Piretrina I e, por exemplo, do análogo sintético fenvalerato (Figura 9), em humanos é reduzida. Contudo, quando administrados por vias em que o seu metabolismo é minimizado (caso da injeção intravenosa) são agentes neurotóxicos potentes [36]. A venda destes pesticidas correspondeu a 2,6% do total de vendas de inseticidas em 2010 [23].

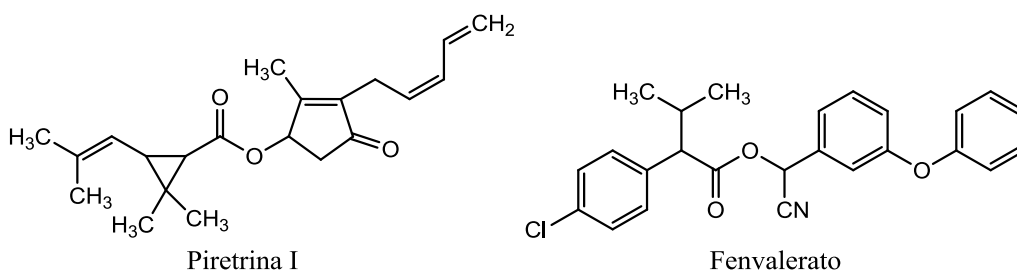


Figura 9 – Exemplos de inseticidas piretroides

### 1.3.2 Inseticidas Organofosforados

Os inseticidas organofosforados (IOFs) são compostos orgânicos que contêm fósforo. São essencialmente triésteres de ácido fosfórico e ácido tiofosfórico e apresentam uma estrutura geral como a apresentada na Figura 10, onde  $R_1$  e  $R_2$  são grupos alquila ou alcóxido de cadeia curta, ou resíduos de aminoácidos, X é um grupo que pode ser facilmente removido ou substituído, e em que o fósforo pentavalente se encontra ligado a um átomo de oxigênio ou de enxofre [37, 38].

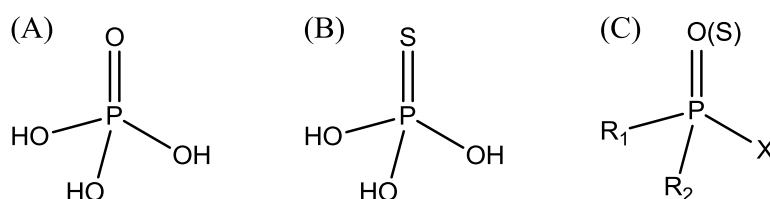


Figura 10 – Estruturas do ácido fosfórico (A), do ácido tiofosfórico (B) e dos IOFs (C)

Variações na estrutura dos substituintes permitem uma larga gama de propriedades físicas, estabilidades químicas, estabilidades biológicas, toxicidade e seletividade [36]. Entre os inseticidas estudados neste trabalho (Figura 6), os grupos  $R_1$  e  $R_2$  são radicais metoxilo ou etoxilo. Apenas um inseticida pertence ao grupo dos fosfatos ( $P=O$ ), nomeadamente o clorfenvinfos, enquanto os restantes são tiofosfatos (clorpirifos, diazinão, fentião, paratião, pirimifos-metilo e quinalfos) ou ditiofosfatos (dimetoato, fosadona e malatião). O substituinte de X apresenta elevada variedade como, por exemplo, grupos alifáticos (caso do dimetoato e do malatião) ou fenóis (paratião e fentião), ligados ao fósforo através de um átomo de oxigénio ou de enxofre. Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades e outras informações sobre os IOFs estudados, assim como gamas de valores recolhidos na bibliografia sobre intoxicações fatais, incluindo também dados internos do STF-N. Verifica-se, por exemplo, que os inseticidas em estudo são voláteis e a maioria deles apresenta valores elevados de coeficiente de partição, ou distribuição, entre as duas fases numa mistura de octanol e água ( $\log K_{ow}$ ).

Tabela 2 – Os inseticidas organofosforados estudados neste trabalho

		Clorfenvinfos	Clorpirifos	Diazinão	Dimetoato	Fentião	Fosalona	Malatião	Paratião	Pirimifos- metilo	Quinalfos
Número de registo CAS <sup>(1)</sup>		470-90-6	2921-88-2	333-41-5	60-51-5	55-38-9	2310-17-0	121-75-5	56-38-2	29232-93-7	13593-03-8
Massa molecular		359,6	350,6	304,3	229,3	278,3	367,8	330,3	291,3	305,3	298,3
Fórmula química		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> ClNO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> PS	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS
log K <sub>ow</sub> (pH 7, 20 °C) [39]		3,85 <sup>(2)</sup>	4,7	3,69	0,704	4,84	4,01	2,75	3,83	3,9	4,44
Pressão de vapor (mPa, 25 °C) [39]		0,53	1,43	6,09 x 10 <sup>-2</sup>	0,247	2,40 x 10 <sup>-2</sup>	1,56 x 10 <sup>-2</sup>	3,1	0,89	2,00 x 10 <sup>-3</sup>	0,346
Retirada do mercado [34]		25-07-2003 <sup>(3)</sup>	n/a <sup>(4)</sup>	06-12-2007	n/a	11-08-2004 <sup>(5)</sup>	22-06-2007	06-12-2007	09-01-2002	n/a	25-07-2003
Esgotamento de stocks [34]		31-12-2003 <sup>(3)</sup>	n/a	06-12-2008	n/a	11-08-2005 <sup>(5)</sup>	22-06-2008	06-12-2008	09-02-2003	n/a	31-12-2003
Classificação da OMS		Ib	II	II	II	II	II	III	Ia	III	II
LD <sub>50</sub> oral, rato (mg kg <sup>-1</sup> )		9,6-39	135-169	1250	387	250	120	1375-2800	2	1414	71
IDA (mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )		0,005	0,01	0,002	0,002	0,007	0,02	0,3	0,004	0,03	-
Valores observados em intoxicações fatais (ppm)	Sangue	1,9-560	0,21-2,05	0,24-277	3,3-52	3,8 & 4,8	-	0,35-517	0,21-34	-	2,2-423
	Conteúdo	+ <sup>(6)</sup>	-	44-1200	104	17 g	-	452-989	+	-	+
	Fígado	- <sup>(6)</sup>	4,1	4-345	4,6	17 & 203	-	198-383	0,08-120	-	-
	Referências	<sup>(7)</sup>	[40]	[40-42]	<sup>(7)</sup> [42, 43]	[41, 42]	-	[40-42, 44]	<sup>(7)</sup> [40-42]	-	<sup>(7)</sup>

(1) CAS – *Chemical Abstract Service*, departamento de registo de substâncias químicas da American Chemistry Society;

(2) Valor do isómero *Z* (o mais abundante: pelo menos 90% das preparações comerciais). O isómero *E* possui um valor de log K<sub>ow</sub> de 4,22 [41];

(3) Prazos de retirada do mercado e de esgotamento de stocks até 30-06-2007 e 31-12-2007, respetivamente, para a aplicação em brássicas (designação comum das plantas do género *Brassica*, da família das Crucíferas, como, por exemplo, a couve, o nabo ou a colza);

(4) n/a – não aplicável, porque esta substância ativa é permitida por lei e, por isso, pode ser comercializada e aplicada;

(5) Prazos de retirada do mercado e de esgotamento de stocks até 30-06-2007 e 31-12-2007, respetivamente, para aplicações localizadas de misturas extemporâneas com um atrativo em citrinos e oliveiras;

(6) O sinal mais (+) significa que foi detetada a presença do pesticida em causa mas o mesmo não foi quantificado, enquanto o sinal menos (-) expressa que não foram encontrados registos do inseticida de intoxicação naquela amostra;

(7) Dados internos da STF-N do INMLCF, I.P..

### 1.3.3 Mecanismo de Ação e Toxicidade dos Inseticidas Organofosforados

Os inseticidas organofosforados, como o etião ou o clorpirifos, reagem com enzimas que possuem o aminoácido serina no centro ativo, como é o caso de algumas esterases. É particularmente conhecida a ação sobre a acetilcolinesterase (ACE), que se encontra ligada à membrana pós-sináptica e decompõe rapidamente a acetilcolina, um neurotransmissor, após a transmissão do impulso nervoso entre os neurónios [18]. A acetilcolinesterase possui dois centros ativos, o centro aniónico (c.a.), que se encontra negativamente carregado, e o centro esterático (c.e.), que possui um resíduo de serina. Num primeiro passo, a parte positivamente carregada da acetilcolina interage com o centro aniónico enquanto um par de eletrões não-ligantes do oxigénio do grupo hidroxilo do resíduo de serina realiza um ataque nucleófilo ao carbono carbonilo da molécula de acetilcolina (Figura 11 – A.1). A formação da ligação éster (Figura 11 – A.2) é acompanhada pela libertação de uma molécula de colina. Esta ligação é depois alvo de hidrólise e a enzima é regenerada (Figura 11 – A.3). Neste passo é gerado ácido acético [38, 45].

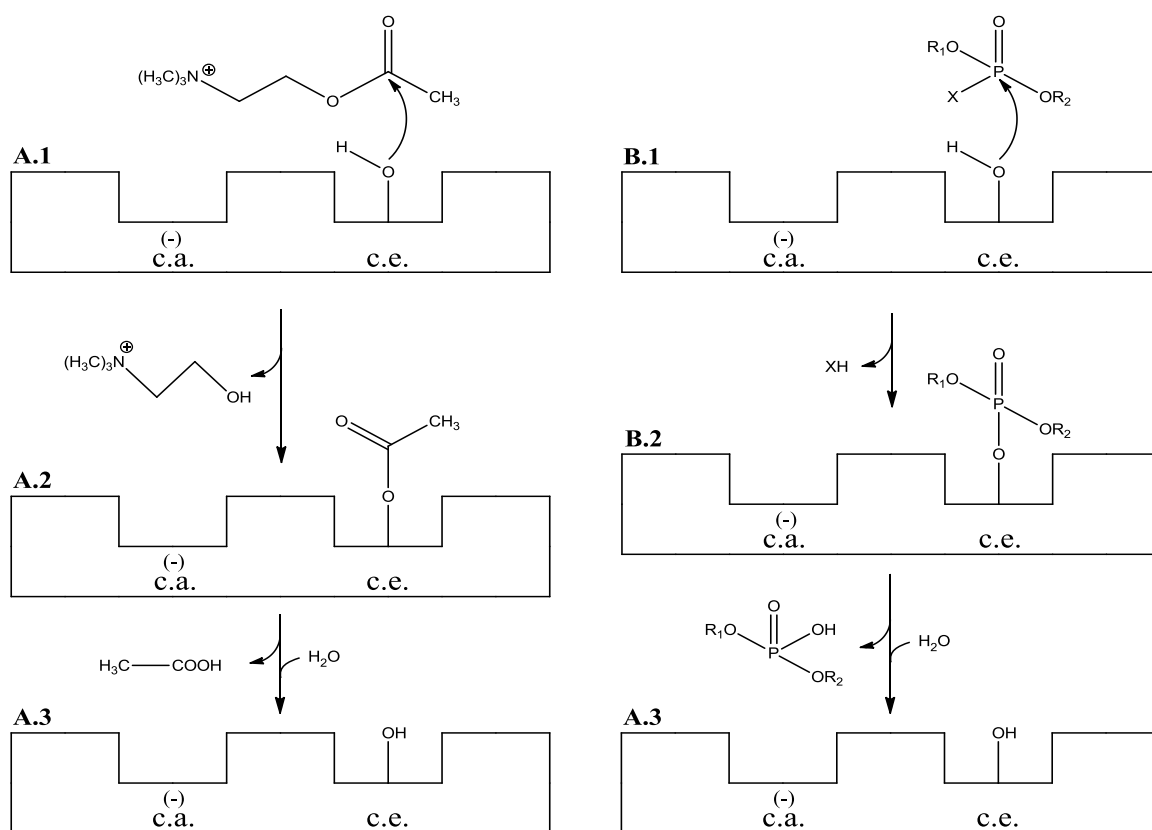


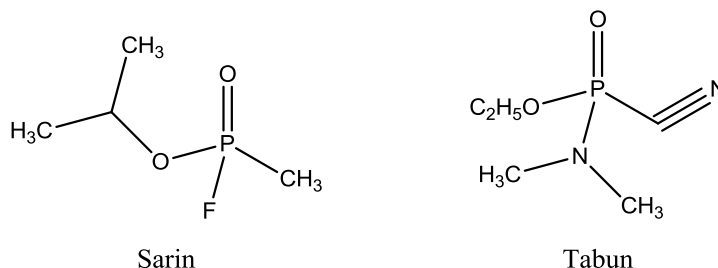
Figura 11 – Mecanismo de ação da acetilcolinesterase na presença de (A) acetilcolina e de (B) fosfatos

Os compostos organofosforados, quando presentes, mimetizam a acetilcolina e ligam-se ao centro esterático da ACE, envolvendo-se numa reação idêntica à sofrida pela acetilcolina, como representado na Figura 11 – B a título de exemplo para um organofosfato. Fruto do ataque nucleófilo ao átomo de fósforo (B.1) a enzima é fosforilada (B.2) e posteriormente hidrolisada para restaurar a enzima livre (B.3). Contudo, enquanto o passo da hidrólise de acetilcolina ocorre muito rapidamente (a ACE pode degradar cerca de 25000 moléculas de acetilcolina por segundo) [46, 47], quando a enzima se encontra fosforilada a hidrólise é muito lenta (pode demorar dias). A fosforilação do resíduo de serina impede a ligação e a degradação da acetilcolina, o que gera a acumulação do neurotransmissor e, consequentemente, a super-estimulação dos nervos colinérgicos, reconhecida pelos clínicos como choque colinérgico [48]. De um modo geral, a capacidade de fosforilar é reduzida pela presença de grupos ‘volumosos’ ligados ao fósforo e, por isso, a maioria dos inseticidas possui grupos alcóxido de cadeia curta, nomeadamente metóxido e etóxido [38]. A reatividade dos compostos organofosforados depende também da eletrofilicidade do átomo de fósforo central, influenciada pela eletronegatividade relativa dos átomos vizinhos (por exemplo, 2,1 para o fósforo, 3,5 para o oxigénio, 3,0 para o azoto, 2,5 para o enxofre e para o carbono). Deste modo, na ligação éster de fosfato ( $P=O$ ), o fósforo é muito mais eletrófilo que na ligação tioéster dum tiofosfato, o que torna os fosfatos muito mais reativos que os tiofosfatos [37].

Os inseticidas com o grupo tiona (como é o caso de quase todos os inseticidas estudados neste trabalho; a exceção é o clorfenvinfos) são protoxinas e, por esse motivo, normalmente conhecidos por inibidores indiretos da ACE, pois não são capazes de fosforilar o resíduo de serina até passarem uma primeira vez pelo fígado, onde a ligação  $P=S$  é oxidada a  $P=O$  [45]. A oxidação ou ativação *in vivo* requer normalmente um período de algumas horas e na maioria dos casos os tiofosfatos ( $P=S$ ) são menos tóxicos que os fosfatos correspondentes ( $P=O$ ) [37].

Em mamíferos, a super-estimulação manifesta-se principalmente por lacrimejo, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes de broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, bem como de depressão do sistema nervoso central, sendo as principais causas de morbidez e mortalidade por estes produtos. Dada a toxicidade dos compostos organofosforados, alguns elementos desta família, como o sarin e o tabun (Figura 12), foram utilizados pelo

Iraque no conflito militar contra o Irão (1980-1988). O sarin foi também usado como arma química em ataques terroristas em Matsumoto e Tóquio (nos anos de 1994 e 1995, respetivamente) [48].



**Figura 12 – A estrutura do sarin e do tabun**

Os IOFs são reativos e rapidamente degradados por oxidação e hidrólise e, por isso, não apresentam problemas graves de bioacumulação e de transferência ao longo da cadeia trófica. A sua persistência no solo é baixa, com valores de semivida típicos a variar entre uma a duas semanas para o malatião e três a seis meses para o paratião e diazinão [37].

### 1.3.4 Toxicocinética dos Inseticidas Organosfosforados

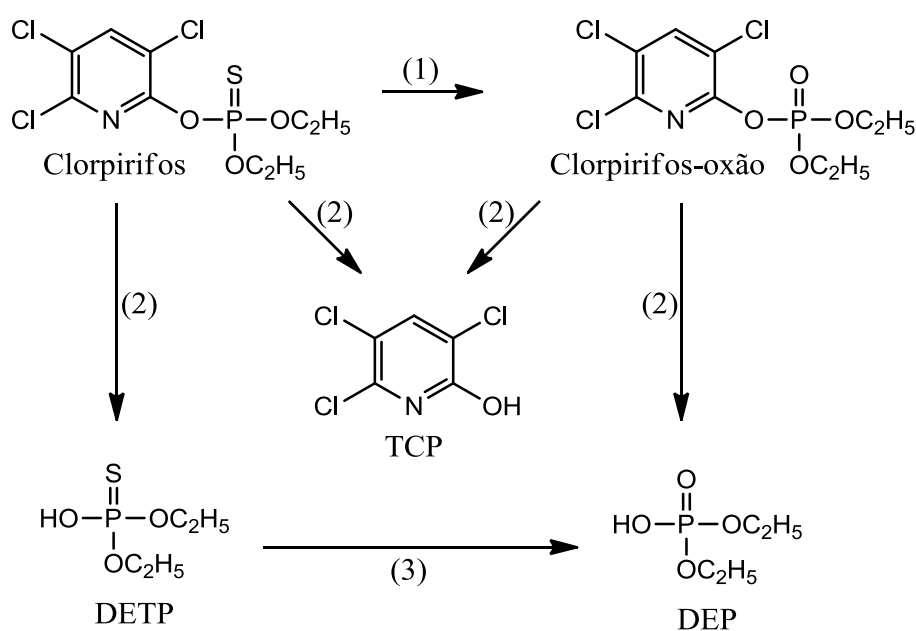
Quando ingeridos, são comuns taxas de absorção na ordem dos 70% ou ainda superiores, e já foram encontrados em fluídos como soro, mucosas cervicais, esperma e leite materno [41, 49-52]. Se forem aplicados ou ingeridos juntamente com solventes orgânicos a absorção é mais rápida [45].

Dado que a sua distribuição por todo o organismo é também rápida os primeiros sintomas de intoxicação podem surgir em poucos minutos se os compostos forem inalados, entre 15 min e 1 hora se forem ingeridos, e 2 a 3 horas após o contato dérmico. No caso dos inibidores indiretos da ACE, como o paratião, os sintomas surgem após um período de tempo maior [45].

A conversão dos tiofosfatos em fosfatos, referida anteriormente, é uma reação de dessulfuração oxidativa da Fase I da biotransformação catalisada essencialmente por oxidases não específicas do Citocromo P450. Na Fase II, o grupo X (Figura 10) biotransformado na Fase I é ainda mais metabolizado, por vezes em reações similares às da Fase I, embora o mesmo possa ser excretado sem mais nenhuma alteração no caso de ser suficientemente polar [53].

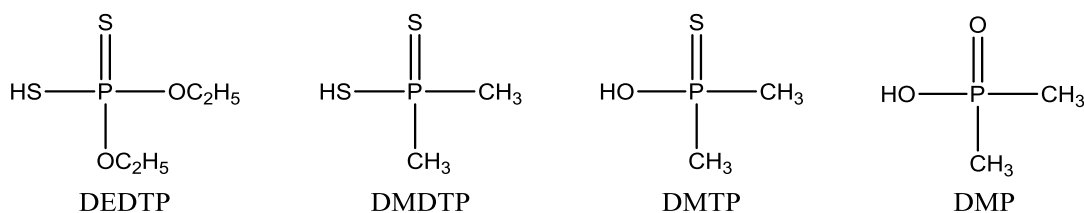


A título de exemplo, é apresentada abaixo a biotransformação do clorpirifos (Figura 13). O clorpirifos é bioativado no fígado após dessulfuração para formar o clorpirifos-oxão, numa reação catalisada pelas oxidases do Citocromo P450 (passo 1). Tanto este metabolito (cerca de 400 vezes mais tóxico que o precursor), como o próprio clorpirifos são hidrolisados pela esterase-A e os produtos de biotransformação mais conhecidos são o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), o dietiltiofosfato (DETP, do inglês diethyltiophosphate) e dietilfosfato (DEP, do inglês diethylphosphate) (passo 2). O DEP pode também ser obtido por dessulfuração oxidativa do DETP (passo 3) [50, 53].



**Figura 13 – Biotransformação do clorpirifos**

Dependendo dos radicais alcóxido ligados ao átomo de fósforo, da biotransformação dos diferentes inseticidas resultam vários alquilfosfatos comuns. Além dos apresentados na Figura 13, nomeadamente, o DETP e o DEP, na metabolização dos inseticidas estudados neste trabalho é expectável encontrar o dietilditiofosfato (DEDTP, do inglês diethylditiophosphate), o dimetilditiofosfato (DMDP, do inglês dimethylditiophosphate), o dietiltiofosfato (DMTP, do inglês dimethyltiophosphate) e o dietilfosfato (DMP, do inglês dimethylphosphate) [38, 49-56]. As estruturas destes metabolitos são apresentadas na Figura 14.



**Figura 14 – Alquilfosfatos comuns resultantes da biotransformação de IOFs**

Em concordância com a toxicocinética de xenobióticos em geral, os IOFs estudados e os seus metabolitos são eliminados através da urina (na sua maioria) e fezes, ou ainda pelo ar expirado [49-52].

### 1.3.5 Análise de Inseticidas Organofosforados

A avaliação de intoxicações com inseticidas organofosforados (IOFs) encontra-se descrita baseada em vários métodos analíticos.

Uma das abordagens baseia-se no facto de os compostos organofosforados inibirem a atividade de várias colinesterases e, desse modo, consiste na medição da atividade das colinesterases. Apesar da ação sobre as acetilcolinesterases das sinapses nervosas ser a mais relevante, a inibição é medida nas enzimas dessa família presentes no sangue. Esta abordagem é usada para fins clínicos, de modo a determinar qual o grau de intoxicação. Em casos de intoxicações agudas, as manifestações surgem após a inibição da atividade em 50% da colinesterase não-específica do plasma, relativamente aos níveis habituais [57, 58]. Contudo, as acetilcolinesterases em hemácias refletem a atividade das acetilcolinesterases das sinapses e são um indicador do efeito bioquímico destes inseticidas [59]. O facto de a atividade determinada depender de complicações hepáticas ou do consumo de drogas, e variar entre as raças humanas, limita a sua aplicabilidade [45].

Uma segunda abordagem baseia-se no facto de, uma vez no organismo, os diferentes inseticidas organofosforados poderem dar origem aos vários alquilfosfatos já referidos anteriormente, nomeadamente, o dimetilfosfato, o dimetiltiofosfato, o dimetilditiofosfato, o dietilfosfato, o dietiltiofosfato e o dietilditiofosfato (Figuras 13 e 14) [45, 55, 56]. Dada a presença destes produtos existem vários métodos que se baseiam na sua determinação [58, 60]. Além destes produtos, existem alguns metabolitos particulares da degradação de certos inseticidas, como é o caso do 3,5,6-tricloro-2-piridinol (Figura 13) [61] e do *p*-nitrofenol [62], produtos da biotransformação do clorpirifos e do paratião, respetivamente. Contudo, o facto de, após a biotransformação, resultarem produtos comuns a vários

inseticidas, a determinação baseada unicamente nestes mesmos produtos pode ser insuficiente para concluir qual ou quais os compostos originais responsáveis pela intoxicação, ou em que concentrações estavam presentes no organismo. Aliás, a estimativa da quantidade de pesticida no organismo requereria a determinação dos vários metabolitos, ou pelo menos os principais, quer fossem os alquilfosfatos ou os metabolitos particulares, os quais podem ser ainda mais biotransformados. A presença de metabolitos dos inseticidas em amostras biológicas, como a urina, é mais um indicador da exposição do que um índice de possíveis efeitos tóxicos [58].

A abordagem que será usada na parte experimental deste trabalho consiste na determinação dos próprios compostos organofosforados não metabolizados em amostras biológicas. Seguir-se-á esta abordagem devido à casuística do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do INMLCF, I.P., que aborda, essencialmente, casos de intoxicações voluntárias fatais, em que o intervalo entre a ingestão e a morte é insuficiente para ocorrer metabolização em grande extensão do agente tóxico.

### ***Amostras escolhidas para a Análise Toxicológica***

Os inseticidas organofosforados têm sido analisados em amostras biológicas, tais como sangue (sangue total, soro ou plasma) [33, 63-69], conteúdo gástrico [43, 70], urina [43, 65, 71], fígado [43, 72], rim [43, 72], entre outras. Na parte experimental deste trabalho pretende-se quantificar os inseticidas selecionados em sangue total e confirmar a presença em conteúdo gástrico.

O sangue foi selecionado porque é o fluido biológico responsável pela distribuição das substâncias tóxicas por todo o organismo [8]. A opção pelo sangue total, em detrimento do soro e do plasma, deve-se ao facto de, após a morte, ocorrerem fenómenos de autólise e metabolização externa de origem bacteriana tornando-se, desse modo, impossível separar os componentes do sangue como, por exemplo, as hemácias. Outro fator que contribuiu para esta escolha foi a hipótese de, com o sangue total, se poder efetuar um teste de rastreio e posterior confirmação e quantificação na mesma amostra [6, 73]. A amostra de sangue deve ser recolhida em zonas em que flua livremente, sem necessidade de pressionar qualquer tecido para a sua obtenção, de modo a evitar a colheita simultânea de fluido intersticial, o qual poderá conter concentrações diferentes das encontradas no sangue [8]. O sangue recolhido é normalmente sangue periférico

(habitualmente das veias femorais, nas pernas) para minimizar a presença de artefactos devido à redistribuição *postmortem*. Este fenómeno consiste na alteração da concentração do composto de interesse ao longo do tempo devido à sua distribuição incompleta na altura da morte, particularmente de compostos lipossolúveis, tais como os inseticidas organofosforados [73, 74].

A opção pela análise do conteúdo gástrico é devida ao facto de os pedidos de análise que chegam aos Serviços de Toxicologia Forense das três delegações do INMLCF, I.P., resultarem essencialmente de intoxicações voluntárias por ingestão. Neste tipo de intoxicações, o conteúdo gástrico, em conjunto com o material regurgitado, são essenciais para os testes de rastreio, especialmente quando não há informação sobre o agente tóxico envolvido, porque possui concentrações mais elevadas dos compostos se o composto tiver sido recentemente ingerido [73]. A experiência mostra também que o conteúdo gástrico se apresenta como uma das matrizes mais complexas e mais heterogéneas estudadas em toxicologia forense. Tal deve-se fortemente aos alimentos ingeridos, à quantidade ingerida, ao intervalo temporal que separa a ingestão e a recolha da amostra, ao pH, entre outros.

Não menos importante do que o tipo de amostra e o local da sua colheita é a preservação da mesma, de forma a não invalidar todo o procedimento analítico. A degradação, como consequência da instabilidade dos próprios inseticidas ou da ação de várias enzimas, pode ser reduzida ou mesmo evitada através da recolha e do armazenamento das amostras a temperaturas baixas. Ageda *et al.* [75] verificaram que após a preservação de amostras de sangue, a que foram adicionados catorze IOFs, a 4 °C durante 24 horas, em apenas dois casos os níveis registados eram inferiores a 85% dos valores iniciais. Observaram ainda que o decréscimo dos níveis dos inseticidas, usado como indicador da degradação, ocorria mais rapidamente para os compostos em que os substituintes de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> eram grupos metoxilo comparativamente com casos em que eram grupos etoxilo. Registaram ainda que os metilfosfatos se decompunham mais rapidamente que os metiltiofosfatos. Dado que no Serviço de Toxicologia Forense as amostras são preservadas a -20 °C, a probabilidade de degradação dos IOFs será muito menor. Aliás, num estudo em que as amostras foram acidificadas e armazenadas a -20 e a -80 °C, Heinig *et al.* verificaram que os compostos organofosforados estudados permaneceram estáveis durante pelo menos 12 meses [76].

Além da necessidade de ser preservada a temperaturas baixas, em alguns casos, por exemplo, de compostos alcaloides, é importante a proteção da exposição à luz de modo a evitar a fotodegradação [8]. A degradação fotoquímica dos inseticidas organofosforados é também conhecida [53]. As amostras líquidas deverão ser recolhidas em tubos ou contentores de vidro com tampas de Teflon, e as amostras sólidas em contentores de plástico de boca larga. As amostras devem preencher totalmente o contentor de modo a minimizar a evaporação dos compostos voláteis e reduzir as perdas oxidativas. Um último ponto a ter em conta é a adição de preservantes [8, 73]. Por exemplo, a adição do fluoreto de sódio é recomendada para posterior análise *postmortem* de álcool, cocaína e monóxido de carbono, mas não deve ser usado em amostras com inseticidas organofosforados [73]. Moriya *et al.* verificaram que, na preservação de amostras de sangue com fluoreto de sódio, o diclorvos se degradou completamente em 15 minutos e o clorpirifos-metilo era muito instável (as estruturas dos compostos são apresentadas na Figura 15) [77].

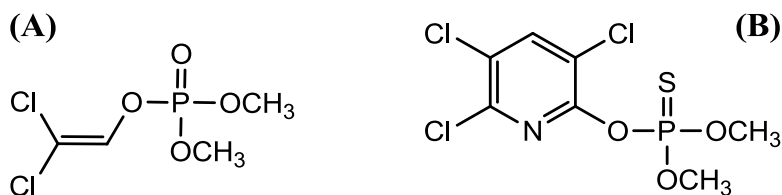


Figura 15 – Estruturas do diclorvos (A) e do clorpirifos-metilo (B)

### ***Extração de Inseticidas Organofosforados***

A análise de substâncias presentes nos diferentes tipos de matrizes biológicas acima referidas (sangue total, soro, plasma, urina, entre outros), requer, em geral, um pré-tratamento da amostra. As razões para isso são várias, tais como a complexidade das matrizes, das quais os compostos são obtidos, ou as concentrações vestigiais, isto é, muito baixas, dos compostos a serem analisados. Um dos procedimentos preparativos é a precipitação de proteínas, designada por desproteínização, após a adição de, por exemplo, acetonitrilo [78]. Este passo muito simples, apesar de permitir a análise por cromatografia (a principal técnica de separação envolvida na determinação dos inseticidas organofosforados), gera uma matriz relativamente complexa, capaz de interferir na separação por cromatografia líquida, e é pouco seletivo. A sua aplicação está limitada a amostras com concentrações elevadas dos inseticidas ou como um passo inicial da preparação de amostras para análise [79]. As técnicas de extração, também conhecidas por

técnicas de pré-concentração, permitem obter uma sub-fração da amostra original que contém os compostos de interesse de modo a que se possa realizar a sua análise, livre de interferentes e numa concentração detetável [80].

As técnicas mais utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida ou microextração em fase sólida [80].

#### • *Extração Líquido-Líquido*

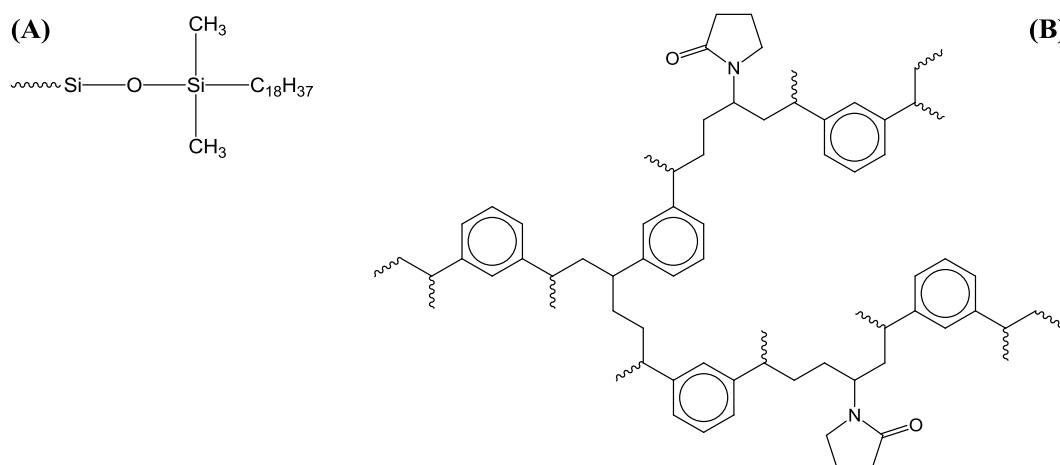
Na extração líquido-líquido (LLE, do inglês Liquid-Liquid Extraction) há a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), e a eficiência do processo depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações realizadas. O valor do coeficiente de partição entre as duas fases, um indicador da afinidade do soluto pelo solvente de extração, pode ser aumentado através do ajuste do pH. São usados solventes como o *n*-hexano [58], o éter dietílico [55], o diclorometano [81] ou a mistura de *n*-hexano e acetato de etilo [82]. Contudo, a dificuldade de automatização e a baixa produtividade, em termos do número de amostras preparadas, limitam a sua aplicação.

#### • *Extração em Fase Sólida*

Esta técnica, designada abreviadamente por SPE (do inglês Solid-Phase Extraction), é um dos procedimentos mais comuns na preparação de amostras. As primeiras referências à sua aplicação na extração de compostos organofosforados no domínio das ciências forenses surgem no final da década de 80 [83, 84]. Em comparação com LLE, que já foi a técnica mais amplamente usada nos laboratórios de toxicologia, a SPE é mais rápida, requer menor manipulação, evita a formação de emulsões, permite obter extratos mais limpos, e é mais reprodutível [85, 86].

Na SPE, os solutos passam de uma fase líquida para uma fase sólida. A adsorção do analito à fase sólida baseia-se em interações de van der Waals em SPE de fase reversa, interações por pontes de hidrogénio em SPE de fase normal, e interações eletrostáticas em SPE de troca iónica. Uma vez que a técnica pode ser realizada para reter compostos interferentes na análise ou os analitos em estudo, quanto mais específicas forem as interações, mais limpo será o extrato final e, como tal, este é um fator a ter em conta no momento de escolher a fase sólida [8]. Na aplicação da SPE na preparação de amostras

para determinação de inseticidas organofosforados no âmbito da toxicologia forense, tem-se verificado o uso de matrizes sólidas de fase reversa como as C<sub>18</sub> [68, 87-90], constituídas por partículas de sílica funcionalizadas com cadeias alifáticas C<sub>18</sub> (Figura 16-A), e de matrizes poliméricas, como as de balanço hidrofílico-lipofílico (Oasis<sup>®</sup> HLB) [33, 40, 66, 69], que possuem simultaneamente um caráter lipofílico e um caráter hidrofílico (Figura 16-B).



**Figura 16 – Fases sólidas usadas em SPE constituídas por partículas de sílica funcionalizadas com grupos octadecilsilano (A) e por uma matriz polimérica Oasis<sup>®</sup> HLB (B).**

O procedimento de extração mais utilizado envolve quatro etapas (Figura 17) e aplica-se quando se pretende reter o analito [6, 8, 85]:

- *Condicionalamento (A)*. Através da passagem de vários solventes ou de misturas de solventes, escolhidos de acordo com a fase sólida e os compostos de interesse, prepara-se a fase sólida para receber a matriz, de modo a garantir a reprodutibilidade das condições de retenção dos compostos de interesse;
- *Retenção do analito (B)*. Com a passagem da amostra líquida pela fase sólida, ocorre retenção dos analitos de interesse e, possivelmente, de algumas impurezas presentes na amostra;
- *Lavagem (C)*. Após a retenção dos compostos um pequeno volume de um líquido de polaridade adequada é adicionado à coluna para remover o resto da amostra que não se encontra adsorvida à fase sólida;
- *Eluição (D)*. Por fim, é adicionado um novo solvente apropriado capaz de provocar a “dessorção” do analito da fase sólida para esse mesmo solvente.

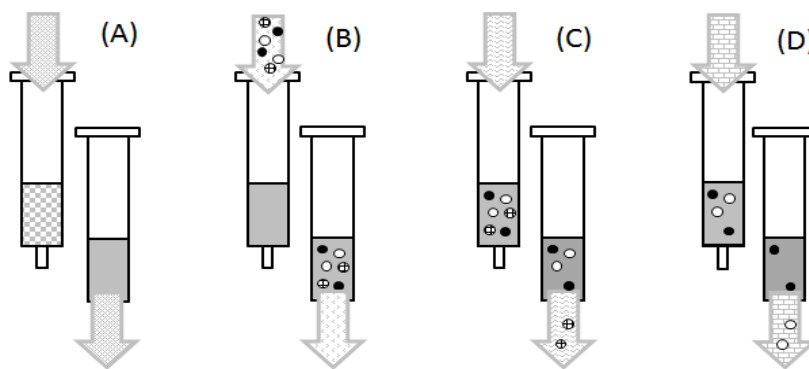


Figura 17 – Procedimento normal de Extração em Fase Sólida

Quando se pretende reter compostos interferentes, após o condicionamento da coluna (A) segue-se a aplicação da amostra com retenção dos compostos interferentes (B) e eluição simultânea do analito (D).

A SPE pode ser realizada *off-line* ou *on-line*. Na SPE *on-line* o eluato da coluna de extração é introduzido diretamente no equipamento de cromatografia, enquanto no modo *off-line* o eluato é recolhido e, posteriormente, é injetado no cromatógrafo. Normalmente na SPE *off-line* o solvente do eluato é evaporado, a que se segue uma ressuspensão do extrato com outro solvente, antes da injeção.

Em contraste com a SPE *off-line*, muito usada para posterior análise por cromatografia gasosa (GC), a extração *on-line* foi robustamente acoplada à cromatografia líquida (LC). Tal pode ser explicado pela boa compatibilidade da fase móvel da LC com o eluato resultante da SPE de amostras ambientais ou biológicas, essencialmente aquosas [91-93], enquanto a junção à GC é mais delicada [94]. Na pesquisa bibliográfica verificou-se que a extração de IOFs em amostras com interesse forense é essencialmente efetuada *off-line* [33, 66, 69].

#### • MicroExtração em Fase Sólida

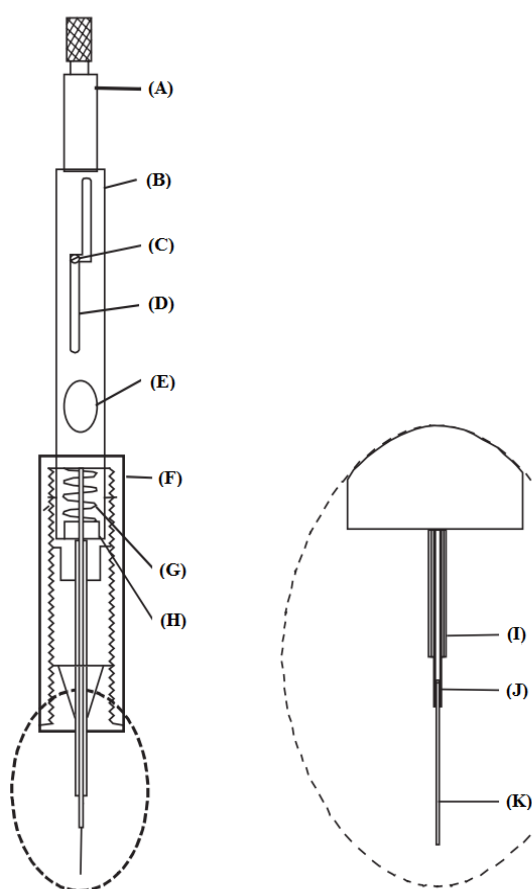
A microextração em fase sólida (SPME, do inglês Solid-Phase MicroExtraction) é uma técnica moderna, desenvolvida por Arthur e Pawliszyn [95]. Esta técnica apresenta algumas vantagens, tais como a não utilização de solventes orgânicos, a redução do período de análise, e a fácil automatização [96].

Neste procedimento, é usada uma fibra recoberta por um filme fino de um polímero (por exemplo, o poli(dimetilsiloxano), o poliacrilato e o poli(divinilbenzeno)), uma mistura de polímeros, ou mesmo adsorvente sólido (por exemplo, carvão ativado) [80]. Essa fibra



(Figura 18) está integrada na extremidade retrátil de uma seringa, que é exposta à amostra que contém o analito [96]. A extração pode ser dividida em extração direta (di-SPME, em que a fibra é colocada em contacto direto com a amostra) e em extração no espaço-cabeça, ou *headspace* (HS-SPME, onde a fibra é exposta na atmosfera contida num frasco contendo a amostra) [80, 96]. As amostras sólidas, se não forem alvo de mais nenhum passo de preparação, só podem ser analisadas por HS-SPME. As amostras líquidas podem ser analisadas por qualquer uma das vias.

As primeiras extrações de inseticidas organofosforados em amostras biológicas foram realizadas por Namera *et al.* [97] e por Mussoff *et al.* [98], para determinação de malatião e de paratão, respetivamente, por HS-SPME. Posteriormente surgiram publicações descrevendo a utilização de di-SPME [65, 71, 99, 100] ou métodos aplicados a vários inseticidas simultaneamente [72, 99, 101].



**Figura 18 – Esquema de uma seringa de SPME**

- (A) – êmbolo
- (B) – corpo cilíndrico da seringa
- (C) – parafuso retentor do êmbolo
- (D) – ranhura em forma de Z
- (E) – janela
- (F) – guia da agulha com a fibra
- (G) – mola
- (H) – septo isolador
- (I) – agulha perfuradora
- (J) – tubo de suporte da fibra
- (K) – fibra de sílica revestida

A técnica baseia-se em fenómenos de partição entre a matriz que contém o analito de interesse e o filme que reveste a fibra, na vertente de extração direta. Na vertente do

espaço-cabeça, dá-se inicialmente partição do analito entre a amostra e a fase gasosa, seguida de partição entre a fase gasosa e a fase sólida que compõe a fibra. O equilíbrio do analito entre as várias fases envolvidas em SPME depende do pH, da força iônica, da temperatura, do material da fibra, da velocidade de agitação [79, 96]. Após adsorção dos compostos de interesse no revestimento da fibra, esta é introduzida no injetor do cromatógrafo, ocorrendo dessorção térmica em GC, enquanto em LC a dessorção é conseguida através da partição com solventes orgânicos, como é exemplo o metanol [79].

#### • *QuEChERS*

A técnica QuEChERS, um acrónimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe*, ou seja, *Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro*. É uma adaptação de SPE (inclusivamente, é designada SPE dispersiva, d-SPE) combinada com um passo inicial de partição líquido-líquido, e o primeiro trabalho foi publicado no ano de 2003 por Anastassiades *et al.* [102]. Sucintamente, o método encontra-se esquematizado na Figura 19 e consistiu na mistura de solvente orgânico, como por exemplo o acetonitrilo, com a amostra (**A**) com agitação para promover a extração líquido-líquido (**B**), a que se seguiu a adição de  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{NaCl}$ , nova agitação (**C**) e centrifugação (**D**) e transferência de 1,0 mL de solvente para um vial com  $\text{MgSO}_4$  e um adsorvente de SPE, adSPE (**E**). Após nova agitação e centrifugação (**F** e **G**), para remover água e interferentes indesejados, foram transferidos 0,5 mL de extrato para um vial, que pode então ser analisado. A adição de sais ( $\text{NaCl}$ ) visa promover o efeito “salting out” por diminuir a solubilidade dos compostos na fase aquosa da amostra, favorecendo a partição para a fase orgânica, enquanto o  $\text{MgSO}_4$  atua como um secante, retirando água e aumentando a concentração dos compostos na fase aquosa, favorecendo a passagem para a fase orgânica. Além de reduzir o volume de fase aquosa, a reação de hidratação do  $\text{MgSO}_4$  é exotérmica, resultando num aquecimento da amostra o que favorece a extração, especialmente dos compostos apolares. A etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados - componentes não-voláteis da matriz podem afetar o injetor e coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções necessárias [103, 104].

Esta técnica, com algumas alterações, tem sido aplicada com sucesso na extração de inúmeros compostos, essencialmente pesticidas, independentemente das classes [105-110].

Entre as alterações contabilizam-se a utilização de tampões (por exemplo, citrato) para estabilizar pesticidas mais lábeis, ou a escolha dos agentes de limpeza, como por exemplo a amina primária-secundária (PSA, do inglês Primary-Secondary Amine, um composto com grupos amino primário e amino secundário com elevado efeito quelante) para remover ácidos orgânicos e outros compostos polares, ou um C18 para remover interferentes não polares como gorduras [103, 104]. O emprego de QuEChERS na extração de inseticidas organofosforados tem sido realizado em matrizes tais como frutos e vegetais [105, 107, 108], óleo de amendoim [106], carne [108], gordura animal [109], ou mel [110].

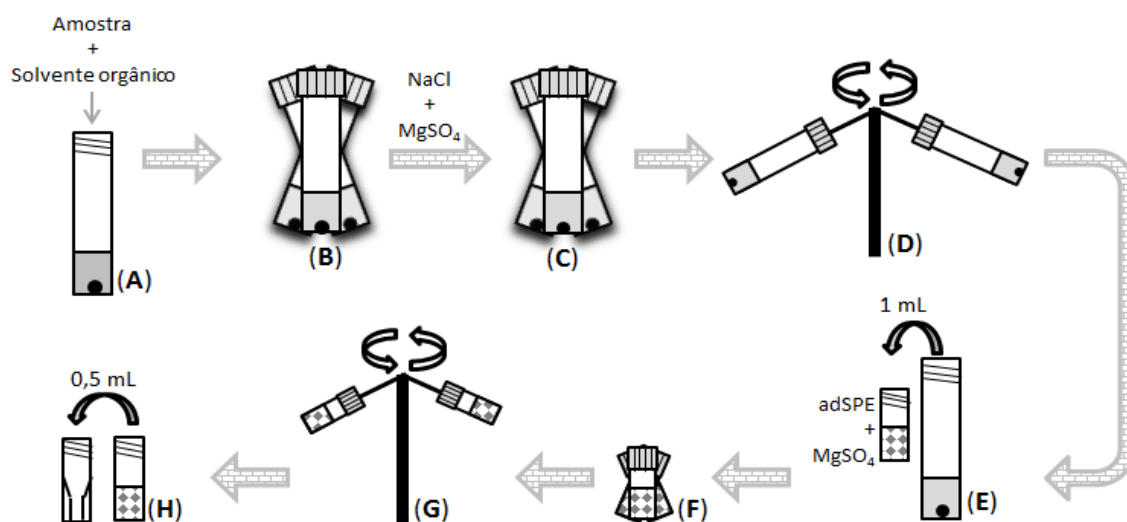


Figura 19 – Esquema representativo de um procedimento QuEChERS

A técnica apresenta diversas vantagens, tais como a reduzida necessidade de manipulação da amostra, a sua simplicidade, bons níveis de recuperação na extração simultânea de compostos muito distintos, logo, com diferentes comportamentos físico-químicos, a partir de matrizes complexas, nomeadamente sólidas e com elevado conteúdo de ácidos gordos ou outros ácidos orgânicos presentes, muito frequentes em alimentos. Dadas as potencialidades e a rápida expansão da técnica prevê-se que venha a ser aplicada em breve na Toxicologia Forense, essencialmente na análise de amostras sólidas. Contudo, tem como principal desvantagem a menor concentração do analito obtida no extrato, em comparação com outras técnicas já muito difundidas, o que requer maiores quantidades de amostra (10 – 15 g). Além disso, o acetonitrilo (um solvente frequentemente utilizado) tem um grande volume de expansão na vaporização ocorrida no injetor (quando aplicado em cromatografia gasosa), o que limita o volume de injeção utilizado [105].

### ***Análise Instrumental de Inseticidas Organofosforados***

Um toxicologista forense, quando recebe uma amostra no laboratório, pode pretender uma de duas coisas: identificar qual o composto tóxico presente na amostra e qual a sua concentração ou, simplesmente, confirmar que um composto em particular está presente e determinar a sua concentração. É também possível que procure a identificação ou a confirmação de vários compostos tóxicos simultaneamente. Nessa sua tarefa, o toxicologista dispõe de várias técnicas de análise, sendo a mais utilizada a cromatografia, e em particular, a cromatografia gasosa [79].

A Tabela 3 permite acompanhar a evolução das técnicas usadas na análise de inseticidas organofosforados. Verifica-se que, até à mudança de século, a separação consistia quase exclusivamente na cromatografia gasosa acoplada a detetores de chama. Numa fase inicial foi usado essencialmente o detetor de ionização de chama, mas o desenvolvimento de detetores específicos (em particular, o detetor termiónico de fósforo e azoto com uma sensibilidade superior) foi acompanhado pelo emprego destes na análise de amostras biológicas. A partir de então, a deteção dos compostos por GC-MS e LC-MS tem-se tornado progressivamente mais comum. No que respeita à extração de compostos organofosforados, não se observou nenhum padrão em particular, tendo as várias técnicas sido aplicadas ao longo do tempo.

A determinação analítica de inseticidas organofosforados focou-se em apenas um inseticida [43, 65, 71], num grupo restrito de IOFs [33, 63, 66, 68, 72] ou inserida numa análise multiresíduos de pesticidas de várias classes [64, 67, 69]. Por exemplo, sobre a análise multiresíduos, Lacassie *et al.* [69] desenvolveram dois métodos para determinação de 29 IOFs e 32 pesticidas de outras 5 classes. Usaram cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS), para compostos voláteis (entre eles, os inseticidas organoclorados e os organofosforados) e cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (LC-MS) para pesticidas polares e termolábeis. Os inseticidas foram extraídos do soro por meio de uma coluna de SPE com matriz polimérica Oasis<sup>®</sup> HLB.

**Tabela 3 – Procedimentos analíticos para determinação de inseticidas organofosforados em amostras biológicas humanas**

Analito(s)	Matriz	Preparação da amostra	Instrumentação	[Referência] (ano)
CLP e 1 Met	Sangue <sup>(a)</sup> , urina	LLE	GC-FPD	[111] (1984)
11 IOFs	Plasma, urina	SPE	GC-FID	[84] (1989)
DIM	Sangue	SPE	GC-FPD	[112] (1990)
DIS e 4 Met	Sangue	SPE	GC-FPD(MS) <sup>(b)</sup>	[113] (1990)
CLP, QUI e 2 Met	Urina	LLE	GC-FID	[58] (1992)
DIA, PAR e 6 Met	Fígado, rim	LLE + GPC	GC-FPD	[114] (1993)
9 IOF	Sangue, urina	HS-SPME	GC-NPD	[115] (1996)
11 IOF e 1 Met	Soro, urina	SPE	LC-DAD	[116] (1997)
MAL	Sangue	HS-SPME	GC-MS	[97] (1997)
25 IOF	Soro	LLE, SPE	HPTLC-FPD	[82] (1997)
MAL	Conteúdo gástrico, fígado, sangue	LLE	GC-MS	[44] (1998)
PAR	Sangue	HS-SPME	GC-MS	[98] (1999)
MAL, TIO e 4 Met	Soro, urina	LLE	GC-FID(MS)	[60] (1999)
3 IOF e 4 IPI	Plasma, urina	SPE	GC-FID	[88] (1999)
CLP e 1 Met	Soro, urina	Desprot	LC-MS	[61] (2000)
29 IOF	Sangue, soro	SPE	GC-MS	[66] (2001)
5 IOF e 9 IOC	Soro	HS-SPME	GC-MS	[101] (2001)
29 IOF (em 61 Pest)	Soro	SPE	GC-MS	[69] (2001)
10 IOF e 16 IOC	Soro, urina	LLE, SPE	GC-NPD(MS)	[81] (2001)
23 IOF	Sangue, soro, urina	LLE	GC-NPD(MS)	[117] (2001)
7 IOF e 15 IOC	Soro, urina	di-SPME	GC-ECD/FPD <sup>(c)</sup>	[99] (2001)
3 IOF e 8 IOC	Sangue	HS-SPME	GC-FPD/MS <sup>(d)</sup>	[118] (2002)
22 IOF	Sangue	HS-SPME	GC-MS	[119] (2002)
37 IOF	Fígado, rim, tecido adiposo	LLE + GPC	GC-MS	[120] (2002)
OME	Bilis, conteúdo gástrico, fígado, rim, sangue, urina	LLE	GC-NPD	[121] (2002)
6 IOF	Fígado, sangue, tecido adiposo	LLE	GC-NPD	[122] (2003)
5 IOF	Soro	SPE	GC-MS	[89] (2003)
MPA	Fígado, sangue, rim	HS-SPME	GC-MS	[123] (2004)
CLP e 16 Met	Urina	LLE	LC-MS	[124] (2005)
4 IOF	Fígado, fluido cefalorraquidiano, plasma, sangue, rim, urina	HS-SPME	GC-NPD	[72] (2005)
DIM	Sangue, urina	di-SPME	GC-MS	[71] (2006)
14 IOF	Sangue	LLE	LC-UV	[75] (2006)
QUI	Sangue, urina	di-SPME	GC-MS	[65] (2006)
10 IOF	Soro	Desprot	LC-MS	[78] (2007)
DIM	Cérebro, conteúdo gástrico, fígado, miocárdio, pulmão, sangue, rim, urina	LLE	GC-MS	[43] (2007)

FEN e 2 Met	Soro	HS-SPME	GC-MS	[125] (2008)
4 IOF	Sangue	SPE	GC-MS	[40] (2009)
6 IOF e 1 Met	Urina	Desprot.	LC-MS	[126] (2009)
4 IOF	Sangue	LLE	LC-MS	[63] (2009)
5 IOF	Plasma	LLE, SPE	GC-FPD	[68] (2010)
3 IOF (em 14 Pest)	Soro	LLE	GC-MS	[64] (2010)
8 IOF	Sangue	SPE	GC-MS	[33] (2010)
2 IOF (em 17 Pest)	Plasma	SPE	GC-MS	[67] (2010)
DIM e OME	Soro	LLE	GC-MS	[127] (2011)

CLP – clorpirifos; DAD – detetor fotodiodo; Desprot – desproteinização; di – imersão direta; DIA – diazinão; DIM – dimetoato; DIS – disulfotão; ECD – detetor de captura eletrônica; FEN – fentião; FID – detetor de ionização de chama; FPD – detetor fotométrico de chama; GC – cromatografia em fase gasosa; GPC – cromatografia de permeação em gel; HPTLC – cromatografia em camada fina de alta performance; HS – headspace; IOC – inseticida organoclorado; IOF – inseticida organofosforado; IPI – inseticida piretroide; LC – cromatografia líquida; LLE – extração líquido-líquido; MAL – malatão; Met – metabolito(s); MPA – metil-paratão; MS – espectrometria de massa; NPD – detetor termiônico de fósforo e azoto; OME – ometoato (ou dimetoato-oxão); Pest – pesticidas; PAR – paratão; SPE – Extração em fase sólida; SPME – microextração em fase sólida; QUI – quinalfos; TIO – tiometão; UV – detetor de radiação ultra-violeta.

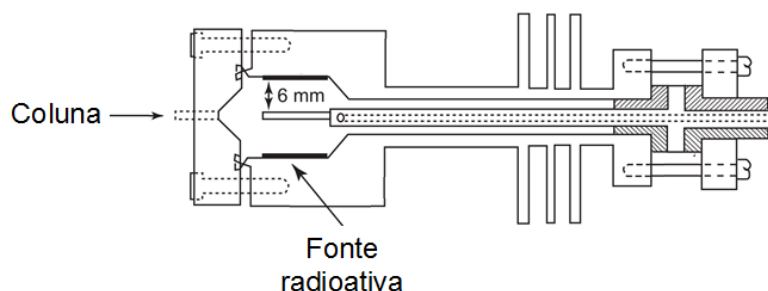
Notas: (a) sangue total; (b) a espectrometria de massa foi usada como método de confirmação; (c) o ECD foi usado só para detecção de IOC; (d) FPD foi usada apenas no desenvolvimento da SPME.

Na parte experimental desta dissertação será usada a cromatografia gasosa com duas técnicas de detecção, nomeadamente Detecção de Captura Eletrônica (ECD) e Espectrometria de Massa (MS).

A utilização do ECD é explicada pelo facto de este ser um dos detetores mais sensíveis ( $10^{-13}$  g s<sup>-1</sup>) para cromatografia gasosa, em particular de compostos halogenados ou que possuam um centro eletrófilo como, por exemplo, o grupo fosfato ou tiofosfato, dos IOFs. Apesar disso, não foram encontradas referências quanto à utilização do ECD na determinação de inseticidas organofosforados em amostras biológicas humanas, ainda que Wielgomas e Czarnowski tenham analisado clorpirifos em fígado de rato [128], Hunter *et al.* [108] diazinão, malatão e clorpirifos em vários alimentos, e Uddin *et al.* [129] malatão e clorpirifos em arroz.

Na captura eletrônica, quando os compostos são introduzidos no detetor passam por uma câmara com uma fonte emissora de partículas  $\beta$  ( $^3\text{H}$  ou  $^{63}\text{Ni}$ ) (Figura 20). O trítio, apesar de mais potente, é mais instável e, por isso, é normalmente usado o  $^{63}\text{Ni}$ . Após a colisão das partículas  $\beta$  (eletrões) com o gás de arraste são produzidos catiões e eletrões secundários. A aplicação de uma diferença de potencial gera uma corrente elétrica. Quando passam compostos eletronegativos pela câmara os eletrões são capturados pelos referidos compostos e há uma diminuição da corrente elétrica. A aplicação pulsada de uma diferença

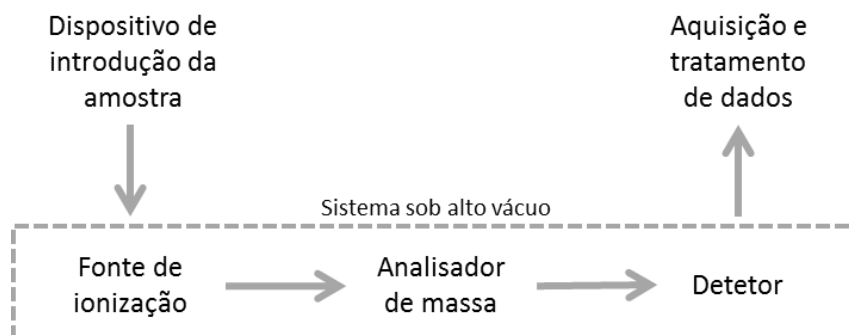
de potencial aumenta a possibilidade de ocorrência de colisões entre elétrons secundários e compostos eletronegativos e, deste modo, a sensibilidade do detetor [130, 131].



**Figura 20 – Detetor de Captura Eletrônica**

O acoplamento da espectrometria de massa à cromatografia gasosa originou um dos métodos analíticos mais sensíveis e mais seletivos para a separação, identificação e quantificação de compostos em misturas orgânicas complexas. Esta técnica fornece informação bidimensional, nomeadamente, o tempo de retenção e o espectro de massa em cada momento da análise [132].

O espectrómetro de massa pode ser representado da seguinte forma [133]:



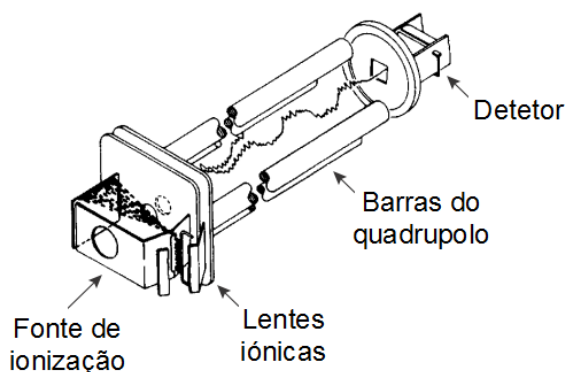
**Figura 21 – Diagrama representativo de um espectrómetro de massa**

Sucintamente, o dispositivo de introdução da amostra transfere a amostra, neste caso, os componentes eluídos da coluna de separação cromatográfica, para uma fonte de ionização, onde quase invariavelmente são produzidos iões positivos. O processo de ionização mais comum é o impacto eletrónico (EI), devido à colisão de elétrons, emitidos por um filamento da fonte de ionização, com as moléculas, levando à perda de um elétron da molécula precursora [132, 133]:



A utilização de uma energia superior à necessária para a obtenção do ião, dito ião molecular ( $M^+$ ), pode conduzir à formação de iões no estado excitado, normalmente instáveis e propensos à dissociação, conduzindo à sua fragmentação e gerando *espectros de massa* com um *padrão de fragmentação* característico de cada composto [132, 133].

Uma vez ionizados os compostos, os iões são ejetados para fora da fonte e há lugar à separação dos iões de acordo com a razão entre a sua massa ( $m$ ) e a sua carga ( $z$ ), representada por  $m/z$ , no analisador de massas. O analisador mais usado em sistemas GC-MS é o quadrupolo (apresentado na Figura 22), constituído por quatro barras cilíndricas, a que são aplicadas voltagens com uma componente contínua ( $cc$ ) e uma variável (radiofrequência,  $rf$ ). Os iões deslocam-se no interior do quadrupolo induzidos pelo campo magnético. Alterando o valor de  $rf$  e  $cc$ , mas mantendo uma dada razão  $rf/cc$  apenas iões com um dado valor  $m/z$  atingem o detetor [133].



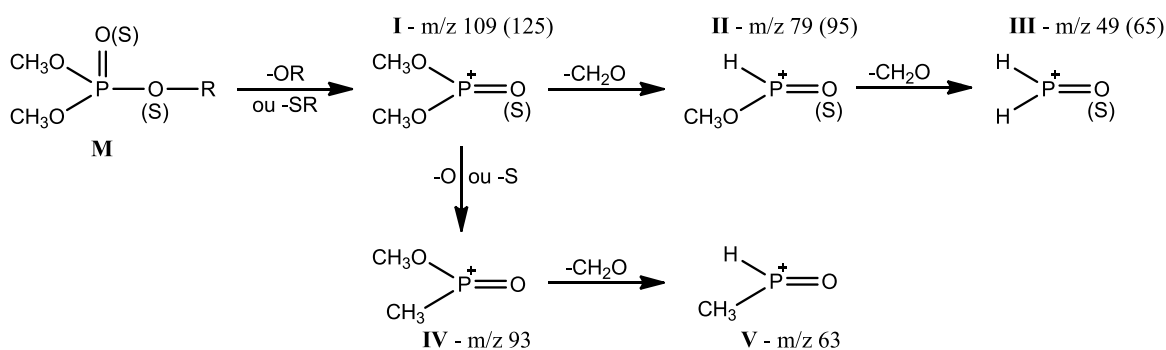
**Figura 22 – Espectrómetro de massa equipado com analisador quadrupolar**

Em espectrometria de massa a informação pode ser adquirida segundo três modos de aquisição: o modo SCAN, o modo SIM e o modo MS/MS. No modo SCAN é selecionada uma gama de razões  $m/z$ , na qual o analisador de massas realiza varrimentos sucessivos. A soma de todas as intensidades adquiridas num dado intervalo e apresentada num cromatograma corresponde à *corrente iónica total* (TIC, do inglês Total Ion Current). O modo de aquisição de *monitorização de iões selecionados* (SIM, do inglês Selected Ion Monitoring) consiste na “focagem” do espectrómetro em apenas alguns iões selecionados. Esta opção permite a deteção de compostos em concentrações mais baixas ( $10^{-14}$  g s $^{-1}$ ), e é particularmente útil em análise quantitativa, mas requer um conhecimento prévio dos compostos a analisar, importante para a seleção dos iões [8, 132, 133]. No modo de aquisição MS/MS, após a separação dos iões, há a seleção de um ião com uma determinada

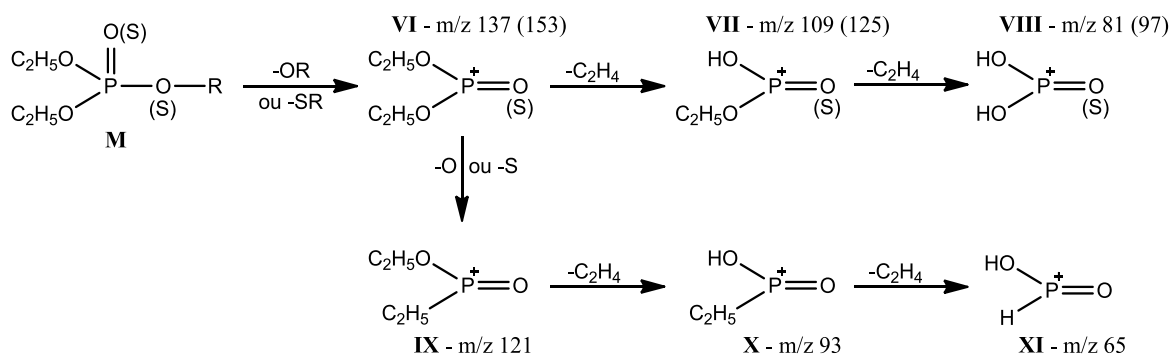


razão  $m/z$  e fragmentação deste por colisão com um gás (por exemplo, árgon), seguida de uma nova separação. A realização de MS/MS não é possível em equipamentos com um quadrupolo simples, mas antes com analisadores *ion trap* ou triplo-quadrupolo. No caso do triplo-quadrupolo, são utilizados três quadrupolos, em que no primeiro há a separação normal dos iões com base na razão  $m/z$ , no segundo a fragmentação de um ião escolhido (por este motivo é denominado por célula de colisão), enquanto no terceiro ocorre a separação dos iões resultantes. O MS/MS permite obter um máximo de sensibilidade e um mínimo de ruído, essencial em análise vestigial, isto é, a concentrações de analito muito baixas. A fragmentação ocorrida permite obter também informação estrutural [8, 133]. O analisador *ion-trap* (consiste em três elétrodos cilíndricos simétricos, em que um deles forma um anel central e os outros formam duas tampas) permite realizar análises sucessivas,  $MS^n$  ( $MS/MS$  corresponde a  $MS^2$ ).

A utilização de MS para a identificação/quantificação de um determinado grupo de compostos requer o conhecimento e/ou estudo detalhado dos seus padrões de fragmentação. Os espectros de fragmentação dos inseticidas organofosforados são caracterizados pela presença de iões-fragmento comuns devidos aos grupos fosforados. A principal origem de iões comuns é a remoção e as sucessivas fragmentações dos grupos fosforados. Nas Figura 23 e 24 são propostos esquemas de fragmentação destes grupos [134]:



**Figura 23 – Padrão geral de fragmentação dos grupos dimetilfosfato e dimetiltiofosfato**



**Figura 24 – Padrão geral de fragmentação dos grupos dietilfosfato e dietiltiofosfato**

O fragmento I obtido após a quebra da ligação C-O (ou C-S), dá origem a iões-fragmento através de perdas sucessivas de moléculas de formaldeído (iões m/z 79 e 49, no caso do dimetilfosfato, e os iões m/z 95 e 65 no caso do dimetiltiofosfato), ou por perda, num primeiro momento, do átomo de O ou S duplamente ligado ao P, substituído pelo O do grupo metoxilo (IV), a que se segue nova remoção de formaldeído (V). O fragmento VI tem fragmentos característicos de remoções consecutivas de moléculas de eteno (VII e VIII, com m/z 109 e 81 para o dietilfosfato, e com m/z 125 e 97 para o dietiltiofosfato). À imagem do que acontece com I, quando VI perde o átomo de O ou S duplamente ligado ao P (IX) sucedem-se novas eliminações de moléculas de eteno (X e XI) [134].

Na tabela que se segue são apresentados os iões obtidos a partir da fragmentação do grupo fosforado por impacto eletrónico [135].

**Tabela 4 – Abundâncias relativas (%) dos iões-fragmento do grupo fosforado dos inseticidas em estudo**

Fragmento	M	I		II		III		IV	V	VI		VII		VIII		IX	X	XI
m/z		125	109	95	79	65	49	93	63	153	137	125	109	97	81	121	93	65
Clorfenvinfos	<1	- <sup>(a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	< <sup>(b)</sup>	-	37	-	58	<	<	<
Clorpirifos	7	-	-	-	-	-	-	-	-	<	<	31	21	100	<	<	<	27
Diazinão	46	-	-	-	-	-	-	-	-	44	99	<	<	34	<	<	40	18
Dimetoato	8	45	-	<	-	<	-	54	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fentião	100	37	33	<	18	<	<	17	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosalona	18	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	22	-	49	-	66	18	38
Malatião	<1	100	-	<	-	<	-	93	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paratião	100	-	-	-	-	-	-	-	-	<	41	31	71	71	13	<	11	23
Pirimifos-metilo	73	-	-	-	-	-	-	-	-	<	<	49	21	<	<	<	28	<
Quinalfos	22	-	-	-	-	-	-	-	-	<	<	<	<	23	<	<	<	<

(a) não aplicável

(b) abundância relativa inferior a 10%

No estudo da fragmentação destes inseticidas, são também comuns os iões representativos da perda do grupo fosforado como, por exemplo, o ião  $m/z$  137 do fentião,  $[M-(OCH_3)_2PS]^+$ , o ião  $m/z$  182 da fosalona,  $[M-(OC_2H_5)_2PS_2]^+$ , e o ião  $m/z$  173 do malatião,  $[M-(OCH_3)_2PS_2]^+$ .

Os espectros dos inseticidas que contêm átomos de Cl e/ou S apresentam ainda distribuições isotópicas características destes elementos, assim como iões representativos da eliminação de um átomo de cloro, como é o caso do clorfenvinfos ( $m/z$  323) e do clorpirifos ( $m/z$  314), a que se segue a perda sucessiva de duas moléculas de eteno ( $m/z$  295 e 267 para o clorfenvinfos, e  $m/z$  286 e 258 para o clorpirifos).

A título de exemplo, é apresentado na Figura 25 uma sugestão do padrão de fragmentação do clorfenvinfos e na Figura 26 o espectro de massa do clorfenvinfos [135].

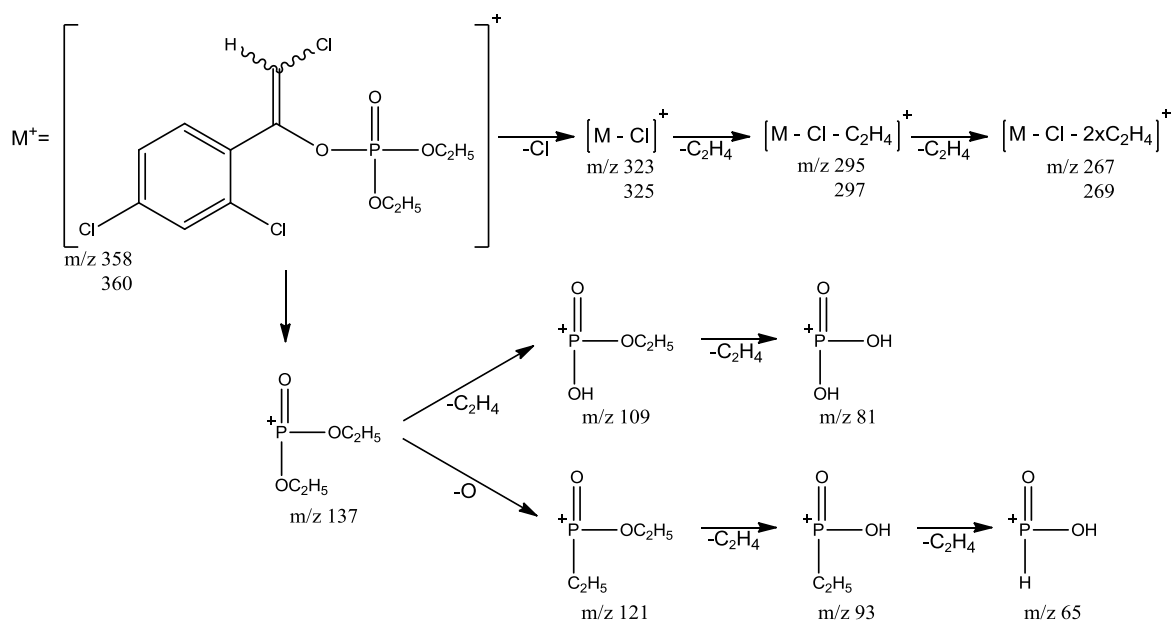


Figura 25 – Padrão de fragmentação do clorfenvinfos

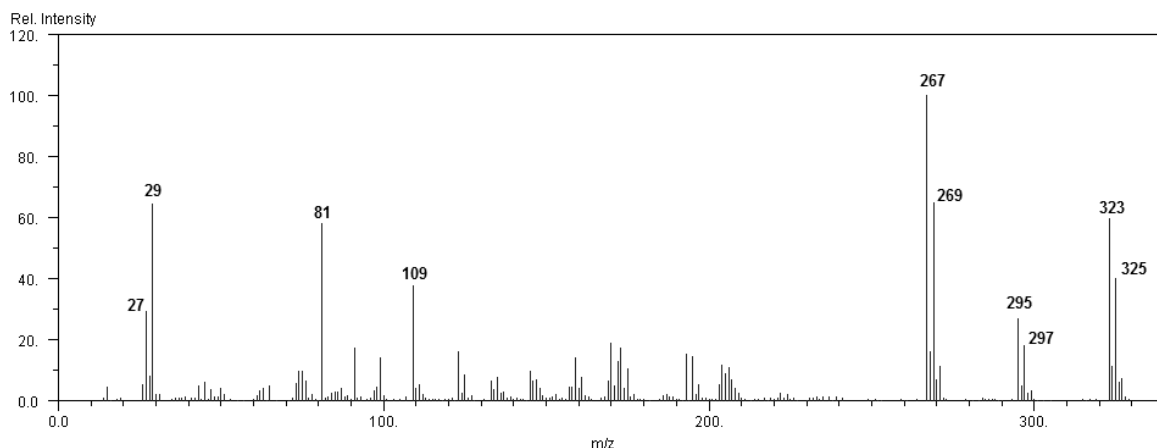


Figura 26 – Espectro de massa do clorfenvinfos

## 1.4 Validação de ensaios

Um laboratório de ensaio e/ou calibração, tendo em vista o reconhecimento externo do trabalho por si realizado, pode pedir a acreditação, por parte de uma entidade competente com recurso à norma *NP EN ISO/IEC 17025:2005* [136], versão portuguesa da Norma Europeia com a mesma designação.

Com a acreditação o laboratório pretende demonstrar a gestão de um sistema de Qualidade, a sua competência técnica e a sua capacidade de emitir resultados tecnicamente válidos. Assim, a Validação de um Procedimento de Ensaio, ainda que o procedimento não esteja inserido no âmbito da acreditação do laboratório, tem como objetivo primário mostrar a adequação do mesmo procedimento para o uso pretendido, de modo a assegurar a qualidade e confiança nos resultados emitidos [136, 137]. Contudo, a validação de um método de ensaio é muito mais do que a mera satisfação num ato singular de um conjunto de requisitos. É, outrossim, um meio para atingir a Qualidade por via de um processo integrado e contínuo, com duração indexada ao ciclo de vida do procedimento de ensaio analítico, implicando reavaliações de alguns dos parâmetros estudados na fase inicial da validação do ensaio [138].

Apesar de algum consenso quanto ao tipo de parâmetros a estudar no decorrer da validação, existe uma grande diversidade de opiniões quanto ao modo de os abordar. De seguida, são apresentados alguns dos requisitos considerados mais relevantes e que serão estudados neste trabalho.

### 1.4.1 Seletividade

Os termos seletividade e especificidade são frequentemente usados indistintamente. A seletividade é vista como a capacidade de um sistema conseguir separar fisicamente as substâncias presentes numa mistura e determinar o analito de interesse recorrendo, por exemplo, a técnicas cromatográficas, enquanto a especificidade se baseia na determinação de um único analito, mesmo na presença de outras substâncias, como impurezas ou componentes da matriz, entre outras [137, 139-141]. Posto isto, a especificidade é entendida como o último nível da seletividade. Contudo, de acordo com as recomendações da IUPAC [142] a especificidade é um termo absoluto, isto é, um método é ou não específico, e neste caso pode apresentar algum grau de seletividade. Por esse motivo, o termo especificidade é considerado incorreto e o seu emprego é desaconselhado de modo a evitar confusões.

### 1.4.2 Gama de trabalho

Qualquer que seja o método desenvolvido ele possui uma gama de concentrações do analito (ou dos analitos) na qual é aplicado. Essa gama é limitada por vários fatores: no extremo inferior, por exemplo, pelos limites de deteção e/ou quantificação, e no extremo superior pela capacidade de resposta linear do instrumento de medição. No entanto, o operador pode estabelecer uma gama mais estreita, denominada gama de trabalho, que sirva o propósito do ensaio [139].

### 1.4.3 Limiares Analíticos

O Limite de Deteção e o Limite de Quantificação são dois conceitos fundamentais na avaliação da performance de um procedimento analítico. O Limite de Deteção (LD) é definido como “o valor medido, obtido segundo um determinado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de se declarar falsa a ausência de um constituinte num material é  $\beta$ , e para uma probabilidade  $\alpha$  de se declarar falsa a sua presença”. A IUPAC recomenda valores por defeito iguais a 0,05 para  $\alpha$  e  $\beta$  [143]. Apesar disso, a própria IUPAC é prudente no emprego do termo “limite de deteção”, preferindo “valor mínimo detetável” [139]. No entanto, uma leitura inferior ao limite de deteção não significa que o analito não se encontra na amostra. Significa apenas que, de acordo com

uma probabilidade definida, a concentração do composto, ou compostos, de interesse é inferior a um certo valor [144].

O Limite de Quantificação (LQ) é a concentração mais baixa de analito que pode ser determinada com um nível de precisão aceitável [138, 139].

#### 1.4.4 Arrastamento

Durante a análise de compostos presentes em concentrações elevadas é possível a transferência de analito de uma amostra para outra à qual não pertence, fruto de operações como [145]:

- adição de padrão interno e reagentes à toma da amostra;
- eluição durante a extração;
- evaporação do extrato;
- diluição do extrato e agitação.

Sempre que se verificar este fenómeno e não for possível a sua eliminação, o procedimento de análise das amostras deve precaver a possibilidade de reanálise de amostras com resultados positivos intercaladamente com amostras brancas ou através de um método de confirmação. Esta é uma das razões da necessidade de o laboratório ter dois procedimentos de análise para cada classe de compostos: um método de rastreio e outro de confirmação de um resultado positivo obtido no rastreio [138].

#### 1.4.5 Eficiência de Extração

A eficiência da extração ( $\eta$ ), ou rendimento, de um analito num ensaio é a resposta do detetor obtida a partir da quantidade de analito adicionada e extraída da matriz em comparação com a resposta do detetor para a concentração real do padrão autêntico puro sem passar pela extração [146, 147].

A eficiência não tem de ser muito alta mas a extensão da eficiência (do analito e do padrão interno) tem de ser consistente, precisa e reprodutível [146, 147].

#### 1.4.6 Exatidão

No seio da Química Analítica vários conceitos têm suscitado dúvidas e divergências quanto ao seu significado e à sua aplicação, apesar do esforço levado a cabo para a construção de um único e consistente esquema conceptual relacionando termos [148]. A

Exatidão é um caso em que tal acontece. De acordo com a versão inglesa do Vocabulário Internacional de Metrologia [143] a exatidão é entendida como a aproximação entre um valor medido e o valor verdadeiro de uma mensuranda, não corresponde a uma grandeza e não lhe é atribuído um valor numérico. Uma medição é dita mais exata quando tem um menor erro de medição. Está relacionada com a Precisão (também designada por Fidelidade) e a Veracidade (ou Justeza) sendo estas consideradas duas vertentes da exatidão numa relação expressa na Figura 27. Posto isto, quanto melhor a performance do ensaio nestes dois parâmetros, melhor será a exatidão e, consequentemente, menor será a incerteza de medição (um parâmetro não-negativo que caracteriza a dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensuranda [143]).

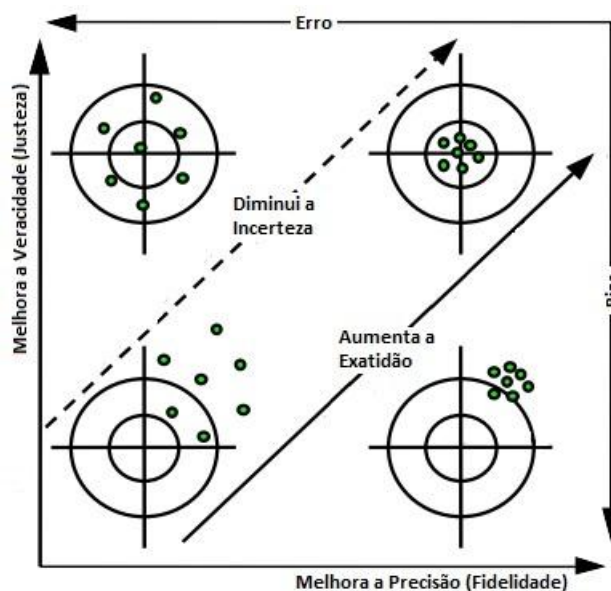


Figura 27 – Relação entre Exatidão, Precisão e Veracidade (adaptada a partir de [148])

A **Precisão de Medição** é vista como a aproximação entre indicações ou valores medidos obtidos por medições repetidas do mesmo objeto ou objetos semelhantes em condições especificadas, e expressa como desvio-padrão, variância, ou coeficiente de variação. É estudada sob condições de repetibilidade (mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições operativas e a mesma localização, e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares, num curto intervalo de tempo), condições de repetibilidade intermédia (mesmo procedimento de medição e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares, durante um intervalo de tempo alargado, mas que pode incluir outras condições que se fazem variar, tais como,

novas calibrações, os padrões, os operadores e os sistemas de medição), ou condições de reprodutibilidade (diferentes locais, operadores e sistemas de medição e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares). A cada um destes três conjuntos de condições de medição corresponde um nível de precisão com a mesma designação, nomeadamente **repetibilidade**, **precisão intermédia** e **reprodutibilidade** [143, 144], ao qual se pode acrescentar a precisão do sistema (com o mesmo sistema de medição, o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares, num curto intervalo de tempo), como apresentado na Figura 28.

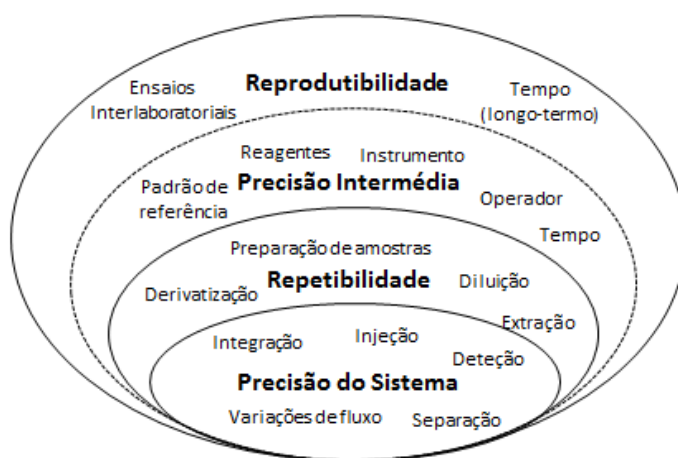


Figura 28 – Os vários níveis de precisão e alguns dos seus parâmetros (reproduzida a partir de [137])

A **Veracidade de medição** é a aproximação entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência, e expressa quantitativamente em termos de erro de veracidade uma vez que não é uma grandeza e portanto não pode ser expressa numericamente. O erro de veracidade, também designado por bias ou viés, é a estimativa de um erro sistemático [143].

Após a validação e implementação do ensaio na rotina laboratorial, a veracidade deve ser regularmente acompanhada, normalmente em paralelo com a análise de amostras de rotina, funcionando como um mecanismo de controlo de qualidade interno.

O estudo da **Incerteza de medição** pode ser realizado segundo várias abordagens [149, 150]:

- abordagem *passo a passo, componente a componente, subanalítica* ou *bottom-up*;
- abordagem baseada em informação de ensaios interlaboratoriais;



- abordagem baseada em dados da validação e/ou controlo de qualidade do método analítico recolhidos em ambiente intralaboratorial.

Os laboratórios podem usar qualquer uma destas, ou outras desde que devidamente justificadas, tecnicamente válidas e aplicáveis aos métodos em estudo, dependendo da informação e recursos disponíveis, bem como da qualidade necessária da estimativa da incerteza tendo em conta o objetivo do ensaio [150].

#### **1.4.7 Robustez**

Apesar de ser um dos pontos menos referidos durante a validação de procedimentos, é considerado um dos mais importantes. Consiste na avaliação da capacidade do método manter o seu desempenho sob as condições típicas de um laboratório e sujeito a algumas variações introduzidas deliberadamente, mostrando assim a sua fiabilidade [137].



## 2 Objetivos do trabalho

Esta dissertação decorre de um estágio curricular no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do INMLCF, I.P. (STF-N). Uma vez que os procedimentos realizados na altura em que se deu início a este trabalho não estavam validados, o principal objetivo foi o desenvolvimento e validação de procedimentos de ensaio para rastreio/confirmação e quantificação de inseticidas organofosforados em sangue total, assim como de procedimentos de ensaio para rastreio/confirmação de IOFs em conteúdo gástrico.

Considerando que este trabalho foi realizado no STF-N, que à imagem de qualquer outro laboratório possui recursos limitados, na parte experimental procurou tirar-se o máximo partido dos meios disponíveis e sempre com a premissa da “*adequação ao propósito*” (ou “*fitness for the purpose*”) em mente.

Assim, como técnica preparativa para sangue total a escolha recaiu sobre a extração em fase sólida, testando-se para o efeito dois tipos de colunas e três procedimentos, dadas as vantagens referidas na Introdução (Capítulo 1.3.5 – Extração de Inseticidas) em comparação com a Extração Líquido-Líquido [86, 151]. A utilização de técnicas como a MicroExtração em Fase Sólida ou de QuEChERS não foi considerada porque o equipamento disponível não está adaptado para a primeira técnica e porque a segunda está ainda a dar os primeiros passos e, por isso, requereria um estudo muito extenso que ultrapassaria o limite temporal deste trabalho.

Na preparação de amostras de conteúdo gástrico pretendeu-se diminuir a quantidade de amostra utilizada (10 gramas) e o método final consiste na conjugação de extração líquido-líquido com extração em fase sólida, após terem sido testadas em separado.

Na separação cromatográfica foram utilizados duas colunas e dois detetores diferentes, embora integrados num único equipamento, uma vez que a emissão pelo STF-N de resultados positivos só poder ser feita após o estudo com dois procedimentos de ensaio diferentes (ainda que estes tenham partes comuns). É primariamente aplicado um procedimento para pesquisa, ou rastreio, da presença de um analito (ou família de analitos) e posteriormente outro para a confirmação através de um segundo procedimento, com possível extensão para a quantificação do(s) composto(s) presente(s). A utilização de dois

sistemas cromatográficos num mesmo equipamento permite também a economia de recursos e espaço no laboratório, e disponibilidade do operador. Acresce ainda que a cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa é uma técnica já amplamente descrita na literatura para a análise de inseticidas organofosforados num contexto de toxicologia forense, mas não a cromatografia gasosa com deteção de captura de eletrões. Logo, nesta Tese pretendeu-se também levar a cabo o primeiro trabalho de desenvolvimento e validação de um procedimento analítico com GC-ECD para amostras biológicas humanas com interesse forense.

### 3 Material e Métodos

Este capítulo apresenta, numa primeira parte, o material usado, a que se segue uma exposição dos vários passos realizados durante o desenvolvimento e validação do procedimento de ensaio para a determinação de inseticidas organofosforados em sangue.

#### 3.1 Material

Na Tabela 5 são apresentados os produtos químicos utilizados nos procedimentos analíticos e algumas informações relativas a estes.

**Tabela 5 – Os produtos químicos utilizados em laboratório**

Tipo de produto	Produto	Fórmula Química	Empresa	Referência
Solventes e reagentes	Acetato de amónio <i>p.a.</i>	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	Merck	CC610016
	Acetonitrilo, <i>HPLC gradient grade</i>	CH <sub>3</sub> CN	Fisher Chemical	A/0627/17
	Ácido acético	CH <sub>3</sub> COOH	Merck	1.00056.2500
	Água destilada e desionizada	H <sub>2</sub> O	Millipore	-
	Cloreto de potássio <i>p.a.</i>	KCl	Merck	1.04936.0250
	Cloreto de sódio <i>p.a.</i>	NaCl	Merck	1.06404.0500
	Clorofórmio <i>p.a.</i>	CHCl <sub>3</sub>	Merck	1.02442.1000
	Éter dietílico <i>p.a.</i>	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O	Merck	1.00921.1000
	n-Hexano <i>p.a.</i>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	Merck	1.04374.2511
	Isooctano, Suprasolv <sup>®</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	Merck	1.15440.1000
	di-Hidrogenofosfato de potássio <i>p.a.</i>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	1.04877.1000
	Hidrogenofosfato de di-sódio <i>p.a.</i>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	K5113780
	Metanol, Chromasolv <sup>®</sup>	CH <sub>4</sub> O	Sigma-Aldrich	34860
	2-propanol <i>p.a.</i>	CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	Merck	1.09634.2500
Gases para cromatografia	Azoto industrial	N <sub>2</sub>	GASIN	-
	Hélio BIP <sup>®</sup>	He	GASIN	-
Padrões de inseticidas	Clorfenvinfos	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	Fluka	36551-250MG
	Clorpirifos	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	Fluka	45395-250MG
	Diazinão	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	Fluka	45428-250MG
	Dimetoato	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	Supelco	442567
	Etião	C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	Supelco	PS92
	Fentião	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	Fluka	36552-250MG
	Fosalona	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> ClNO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	Fluka	36194-100MG
	Malatião	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	Fluka	36143-100MG
	Paratião	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> PS	Fluka	45607-100MG
	Pirimifos-metilo	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	Fluka	32058-250MG
	Quinalfos	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	Fluka	45651-250MG

Foi ainda utilizado o seguinte material:

- colunas de SPE Oasis<sup>®</sup> HLB 30µm, 3cc da Waters
- colunas de SPE Sep-Pak<sup>®</sup> Vac 3cc (500 mg) C18 da Waters
- material de vidro, como balões volumétricos de 5 e 10 mL
- micropipetas de 10, 20, 100, 200, e 1000 e 3000 µL

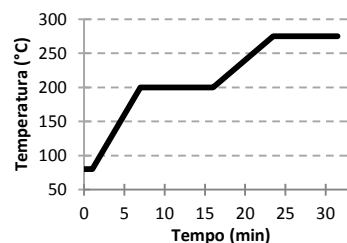
### 3.2 Equipamento

Neste trabalho foi utilizado um equipamento de cromatografia gasosa, equipado com duas colunas cromatográficas e com dois detetores diferentes, um detetor de micro-célula de captura eletrônica e outro de espectrometria de massa.

A Tabela 6 resume as condições experimentais seguidas na análise cromatográfica com detecção de captura de elétrons após testes para obter o sinal mais intenso.

**Tabela 6 – Condições usadas em GC-ECD**

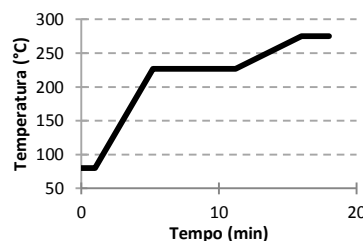
<b>Equipamento</b>	Cromatógrafo de gás	Agilent 6890N, com obtenção e tratamento de dados computadorizado: Software Enhanced Chemstation G1701DA, versão E.02.00.493
	Autoamostrador	Agilent 7683
<b>Injetor</b>	Temperatura	280 °C
	Volume de amostra injetado	1 µL
	Pressão	12,35 psi
	Modo de injeção	Splitless
	Caudal de purga ( <i>purge flow</i> )	50,0 mL/min
	Tempo de purga ( <i>purge time</i> )	2,00 mL/min
<b>Coluna</b>	Modelo	Varian factorFour VF-5MS 0.32
	Características	60 m / 0,32 mm / 0,25 µm
	Gás de arraste	Hélio BIP
	Caudal do gás de arraste	1,2 mL/min (modo <i>constant flow</i> )
<b>Forno</b>	Temperatura inicial	80 °C
	Duração do patamar	1 min
	Rampa de Temperatura	20 °C/min
	Temperatura Final da Rampa	200 °C
	Duração do patamar	9,0 min
	Rampa de Temperatura	10 °C/min
	Temperatura Final da Rampa	275 °C
	Duração do patamar	8,0 min
	Duração Total da Corrida	31,5 min
<b>Detetor</b>	Detetor de micro-célula de captura eletrônica	Agilent G2397A
	Temperatura	320 °C
	Fonte de radiação	Máximo de 65,87 keV, 15 mCi de <sup>63</sup> Ni
	Gás de make-up	Azoto BIP <sup>®</sup>
	Caudal do gás de make-up	60,0 mL/min (modo <i>constant make-up flow</i> )



A Tabela 7 resume os parâmetros experimentais seguidos na análise cromatográfica com detecção por espectrometria de massa.

**Tabela 7 – Condições usadas em GC-MS**

<b>Equipamento</b>	Cromatógrafo de gás	Agilent 6890N, com obtenção e tratamento de dados computadorizado: Software Enhanced Chemstation G1701DA, versão E.02.00.493
	Autoamostrador	Agilent 7683
<b>Injetor</b>	Temperatura	280 °C
	Volume de amostra injetado	2 µL
	Pressão	12,72 psi
	Modo de injeção	Split, numa razão de 38,5:1
	Caudal de split	50,0 mL/min
<b>Coluna</b>	Modelo	HP-5MS, Agilent 19091S-433
	Características	30 m / 0,25 mm / 0,25 µm
	Gás de arraste	Hélio BIP®
	Caudal do gás de arraste	1,3 mL/min (modo <i>constant flow</i> )
<b>Forno</b>	Temperatura inicial	80 °C
	Duração do patamar	1 min
	Rampa de Temperatura	35 °C/min
	Temperatura Final da Rampa	227 °C
	Duração do patamar	6,0 min
	Rampa de Temperatura	10 °C/min
	Temperatura Final da Rampa	275 °C
	Duração do patamar	2,0 min
	Duração Total da Corrida	18,0 min
<b>Detetor</b>	Espectrômetro de massas	Agilent 5973N
	Temperatura da linha de transferência	280 °C
	Temperatura da fonte de ionização	230 °C
	Temperatura do Quadrupolo	150 °C
	Modo de ionização	Impacto eletrônico
	Modo de aquisição	SIM (na identificação foi também usado SCAN)
	<i>Solvent Delay</i>	5,0 min



### 3.3 Preparação de Soluções

Foram preparadas soluções-mãe de todos os padrões puros em tolueno com uma concentração entre 4000 a 6000 mg/L. Posteriormente foram também preparadas soluções de trabalho de 100 e 1,0 mg/L em isooctano, com clorfenvinfos, clorpirifos, diazinão, dimetoato, fentião, fosadona, malatião, paratião e quinalfos. No caso do pirimifos-metilo prepararam-se soluções de 100 e 1,0 mg/L, enquanto para o etião apenas se preparou uma solução de 100 mg/L.

O etião foi utilizado como padrão interno porque é também um inseticida organofosforado (um dietoxifosfato) e, por isso, apresentaria um comportamento semelhante aos inseticidas estudados, e por permitir a redução de custos em comparação aos compostos deuterados. Por outro lado, a venda e a aplicação de produtos fitofarmacêuticos com etião é proibida desde 2003. Todas as soluções foram armazenadas e mantidas a -18 °C.

Foi preparada uma solução-tampão de acetato de amônio de pH 4,9 a partir da mistura de 3,3 mL de ácido acético e 7,7 g de acetato de amônio, sendo o volume final ajustado a 1 litro com água destilada e desionizada. Foi também preparada uma solução-tampão de pH 7 (PBS – phosphate buffered saline solution) num frasco de 1 litro a partir de 200 mg de KCl, 8000 mg de NaCl, 200 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 1150 mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , a que se adicionou um 1 L de água destilada e desionizada.

### 3.4 Desenvolvimento do Procedimento de Extração em Sangue

Neste trabalho foram testados três procedimentos de extração em fase sólida. Dois procedimentos, com colunas HLB, foram adaptados a partir de trabalhos recentes, nomeadamente de Park *et al.* [40] e de Raposo *et al.* [33], com as designações “*HLB\_Park*” e “*HLB\_Raposo*”, respetivamente. O terceiro procedimento testado, denominado por “*Sep-Pak\_10*”, com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> C18, baseou-se no trabalho de Liu *et al.* [84]. Foram preparadas amostras, fortificadas e não fortificadas, em simultâneo, e extraídas de acordo com três estes procedimentos em dois dias diferentes e comparadas as médias das áreas dos picos para todos os inseticidas, e pesquisada a presença de picos interferentes. Posteriormente, foram também avaliadas duas pequenas alterações a este último procedimento, em particular na fase de condicionamento da coluna de SPE: o método de partida consistia na utilização de volumes de 10 mL dos diferentes solventes, que foram diminuídos para apenas 5 e 2 mL, “*Sep-Pak\_5*” e “*Sep-Pak\_2*”. Todas as amostras foram analisadas por GC-MS com deteção em modo SIM (GC-MS-SIM) e GC-ECD.

As diferentes metodologias testadas são apresentadas de seguida:



*HLB\_Park*

- num tubo de centrífuga de vidro de 8 mL, diluir 0,5 mL de amostra em 5 mL de PBS e homogeneizar;
- centrifugar a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 20 minutos (min);
- condicionar a coluna Oasis<sup>®</sup> HLB:
  - 2 mL de metanol;
  - 2 mL de água destilada;
- aplicar a amostra na coluna, 1-2 mL/min;
- lavar a coluna com 2 mL de metanol em água a 5%;
- secagem a vácuo durante 15 min;
- eluir os analitos com 2 mL de metanol;
- evaporar o solvente até à secura à temperatura ambiente (sob corrente de azoto ou num evaporador rotativo);
- retomar o extrato em 100 µL de isooctano num vial com *insert*, e injetar no cromatógrafo.

*HLB\_Raposo*

- num tubo de centrífuga de vidro de 8 mL, diluir 0,5 mL de amostra em 5 mL de tampão de acetato de amónio e homogeneizar;
- centrifugar a 3000 rpm durante 20 min;
- condicionar a coluna Oasis<sup>®</sup> HLB:
  - 2 mL de metanol;
  - 2 mL de água destilada;
- aplicar a amostra na coluna, 1-2 mL/min;
- lavar a coluna com 2 mL de metanol em água a 5%;
- secagem a vácuo durante 15 min;
- eluir os analitos com 2 mL de metanol:2-propanol (1:1)
- evaporar o solvente até à secura à temperatura ambiente;
- retomar o extrato em 100 µL de isooctano num vial com *insert*, e injetar no cromatógrafo.

*Sep-Pak\_10 / Sep-Pak\_5 / Sep-Pak\_2*

- num tubo de centrífuga de vidro de 8 mL, diluir 0,5 mL de amostra em 5 mL de água destilada e homogeneizar;

- centrifugar a 4000 rpm durante 30 min;
- condicionar a coluna Sep-Pak<sup>®</sup> C18:
  - 10 / 5 / 2 mL de clorofórmio:2-propanol (9:1);
  - 10 / 5 / 2 mL de acetonitrilo;
  - 10 / 5 / 2 mL de acetonitrilo:água destilada (1:1);
  - 10 / 5 / 2 mL de água destilada;
- aplicar a amostra na coluna, 1-2 mL/min;
- lavar a coluna com 10 mL de metanol em água a 5%;
- secagem a vácuo durante 15 min;
- eluir os analitos com 3 mL de clorofórmio:2-propanol (9:1);
- evaporar o solvente até à secura à temperatura ambiente;
- retomar o extrato em 100 µL de isooctano num vial com *insert*, e injetar no cromatógrafo.

### 3.5 Desenvolvimento do Procedimento de Extração em Conteúdo Gástrico

Foram estudados diferentes procedimentos de extração, realizados em quadruplicado (duas amostras fortificadas e duas amostras não fortificadas), os quais são apresentados de seguida:

#### *SPE*

- num tubo de centrífuga de vidro de 8 mL, diluir 0,5 mL de amostra em 5 mL de água destilada e desionizada;
- condicionar a coluna Sep-Pak<sup>®</sup> C18 de SPE, como descrito no procedimento *Sep-Pak\_2* para sangue;
- aplicar a amostra;
- lavar a coluna com 10 mL de água destilada;
- secar a coluna a vácuo, durante 15 min;
- eluir os analitos com 3 mL de clorofórmio:2-propanol (9:1) [recolher o eluato para um tubo de centrífuga de 5 mL];
- evaporar o solvente até à secura à temperatura ambiente;
- retomar o extrato em 100 µL de isooctano num vial com *insert*, e injetar no cromatógrafo.

*LLE*

- num frasco de polipropileno de 10 mL com tampa colocar 3 mL de éter dietílico e 0,5 mL de amostra;
- agitar durante 15 min num agitador rotativo Heidolph REAX 2;
- centrifugar durante 30 min a 4000 rpm;
- transferir a fase orgânica para um tubo de vidro de 5 mL;
- evaporar o solvente até à secura à temperatura ambiente;
- retomar o extrato em 100 µL de isooctano num vial com *insert*, e injetar no cromatógrafo.

*LLE\_(...)\_SPE* [dado que num dos passos deste procedimento foram testados diferentes solventes o nome completo do procedimento é apresentado mais adiante, de acordo com o solvente em causa]

- num frasco de polipropileno de 10 mL com tampa colocar 3 mL de éter dietílico e 0,5 mL de amostra;
- agitar durante 15 min num agitador rotativo Heidolph REAX 2;
- centrifugar durante 30 min a 4000 rpm;
- transferir a fase orgânica para um tubo de vidro de centrífuga e evaporar sob corrente de azoto;
- ressuspender em 3 mL de um seguintes solventes (adquirindo o procedimento a respetiva designação):
  - acetonitrilo (com este solvente o procedimento é designado por *LLE\_ACN\_SPE*);
  - água (*LLE\_Água\_SPE*);
  - éter dietílico (*LLE\_Éter\_SPE*);
  - hexano (*LLE\_Hex\_SPE*);
  - metanol (*LLE\_MetOH\_SPE*);
- condicionar a coluna Sep-Pak<sup>®</sup> C18 de SPE, como descrito no procedimento *Sep-Pak\_2* para sangue;
- aplicar a amostra e recolher o solvente da amostra para um tubo de centrífuga (designado por eluato 1);
- lavar a coluna com 10 mL de água destilada [rejeitar] ;
- secar a coluna a vácuo, durante 15 min;

- eluir os analitos com 3 mL de clorofórmio:2-propanol (9:1) e recolher o eluato para um tubo de centrifuga (designado por eluato 2);
- evaporar o solvente dos eluatos\_1 e eluatos\_2 até à secura à temperatura ambiente;
- retomar os extratos em 100 µL de isooctano num vial com *insert*, e injetar no cromatógrafo.

### 3.6 Validação do Procedimento de Ensaio em Sangue

A validação dos procedimentos de ensaio foi realizada usando os métodos *Sep-Pak\_2* e *LLE\_ACN\_SPE*, para sangue total e conteúdo gástrico, respetivamente. Todas as informações necessárias quanto aos passos seguidos nesse processo são apresentadas nos Resultados.

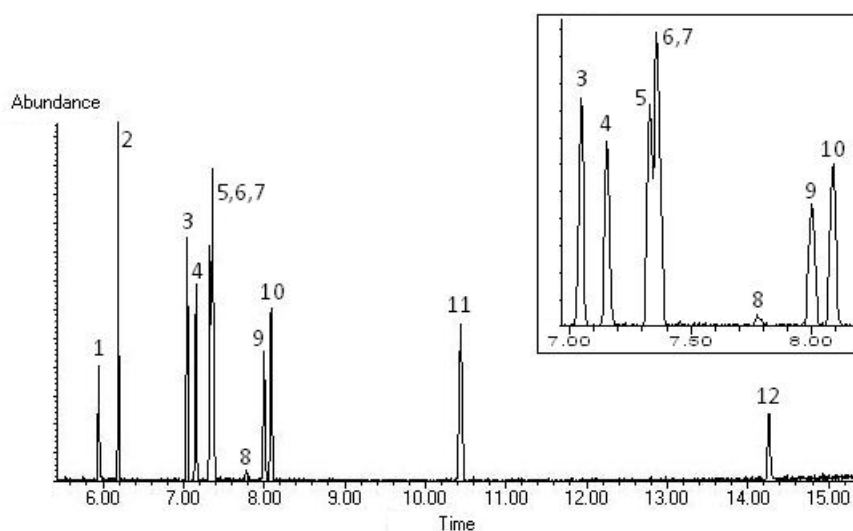
## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Identificação dos Compostos

#### 4.1.1 Detecção por Espectrometria de Massa

O trabalho teve início com a injeção de soluções-padrão 5 µg/mL dos compostos em estudo para determinação dos tempos de retenção dos mesmos, assim como a aquisição dos espectros de massa em modo SCAN correspondentes. Todos os compostos foram identificados deste modo, com correspondências superiores a 90 % com os espectros da base de dados. Os espectros obtidos são apresentados em **Anexo A**.

Na Figura 29 é apresentado um cromatograma de GC-MS em modo SCAN (GC-MS-SCAN) de uma mistura dos compostos, observando-se a sobreposição dos picos de clorpirifos, de fentião e de paratião. Contudo, dado que os três inseticidas apresentam padrões de fragmentação e a maior parte dos iões característicos distintos, tal sobreposição não constitui um problema para a sua determinação e quantificação destes pesticidas, com detecção em modo SIM.



**Figura 29 – Cromatograma TIC de GC-MS-SCAN de uma mistura dos inseticidas estudados**

(1) Dimetoato; (2) diazinão; (3) pirimifos-metilo; (4) malatião; (5) fentião; (6) clorpirifos; (7) paratião; (8) clorfenvinfos, isômero *E*; (9) clorfenvinfos, isômero *Z*; (10) quinalfos; (11) etião; e (12) fosfalona.

Assim, a escolha dos iões para a análise com detecção em modo MS-SIM teve por base os espectros de massas obtidos em modo SCAN, tendo sido escolhidos, pelo menos,

três dos íões mais intensos de cada analito e que não apresentavam, simultaneamente, interferências significativas por parte de outros analitos, como foi o caso do íão  $m/z$  109 comum ao fentião e ao paratião, que possuíam tempos de retenção muito próximos.

Os íões escolhidos para cada composto, assim como os respectivos tempos de retenção e tempos de retenção relativos, são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8 – Tempos de retenção, tempos de retenção relativos e íões selecionados dos inseticidas obtidos em GC-MS**

Inseticidas	t.r. (min)	t.r.r. (min)	Íões escolhidos para SIM ( $m/z$ )
(1) Dimetoato	5,95	0,57	<u>87</u> <sup>(a)</sup> , 93, 125, 229
(2) Diazinão	6,20	0,59	137, 153, <u>179</u> , 304
(3) Pirimifos-metilo	7,06	0,67	276, <u>290</u> , 305
(4) Malatião	7,16	0,68	127, 158, <u>173</u>
(5) Fentião	7,34	0,70	79, 153, <u>278</u>
(6) Clorpirifos	7,37	0,70	<u>197</u> , 286, 314
(7) Paratião	7,38	0,70	139, 186, 235, <u>291</u>
(8 e 9) Clorfenvinfos	7,78 e 8,01 <sup>(b)</sup>	0,74 e 0,77	<u>267</u> , 295, 323
(10) Quinalfos	8,10	0,77	118, <u>146</u> , 157, 298
(11) Etião	10,47	1,00	<u>231</u> , 153
(12) Fosalona	14,29	1,36	121, 154, <u>182</u> , 367

(a) – o íão sublinhado foi selecionado para quantificação

(b) – o pico com o tempo de retenção 8,01 minutos corresponde ao isômero Z, o mais abundante

#### 4.1.2 Detecção de Captura Eletrônica

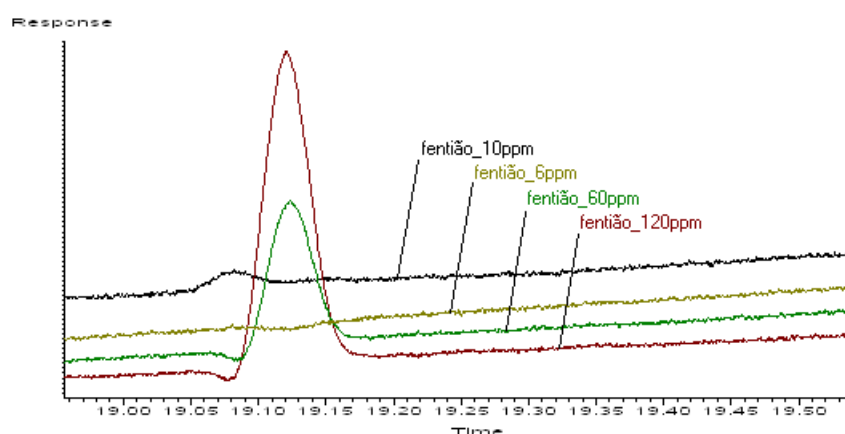
Tal como na detecção por MS, o trabalho em GC-ECD teve início com a determinação dos tempos de retenção e dos tempos de retenção relativos dos compostos a partir da injeção de soluções-padrão, os quais são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9 – Tempos de retenção e tempos de retenção relativos dos inseticidas obtidos em GC-ECD**

Inseticidas	t.r. (min)	t.r.r. (min)
(1) Dimetoato	14,51	0,62
(2) Diazinão	14,68	0,63
(3) Pirimifos-metilo	18,13	0,78
(4) Malatião	18,77	0,80
(6) Clorpirifos	18,84	0,81
(5) Fentião	19,12	0,82
(7) Paratião	19,22	0,82
(8 e 9) Clorfenvinfos	20,10 e 20,57 <sup>(a)</sup>	0,86 e 0,88
(10) Quinalfos	20,69	0,89
(11) Etião	23,35	1,00
(12) Fosalona	26,75	1,15

(a) o pico com o tempo de retenção 20,57 min corresponde ao isômero Z, o mais abundante

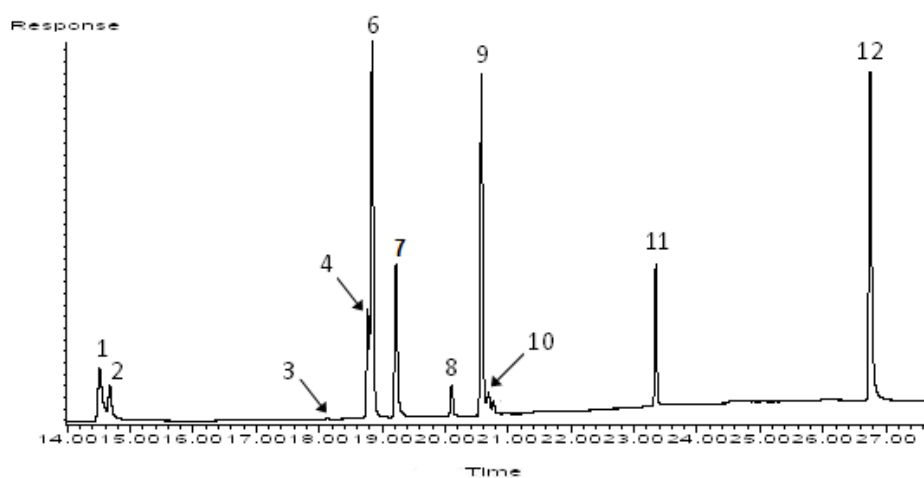
A determinação do tempo de retenção só possível após a injeção de soluções-padrão com diferentes concentrações de fentião (6, 10, 60 e 120  $\mu\text{g/mL}$ ; Figura 31). Só na solução-padrão de concentração 10  $\mu\text{g/mL}$ , correspondente ao dobro do limite superior da gama de trabalho que se pretendia utilizar neste trabalho em amostras de sangue (e que será abordada mais à frente), foi possível detetar o fentião, embora com um pico muito pouco intenso. Uma vez que o detetor é pouco sensível ao inseticida, o fentião não foi considerado na componente da validação das metodologias que envolviam GC-ECD.



**Figura 30 – Cromatogramas de soluções-padrão de fentião de diferentes concentrações**

Observou-se também a alteração dos tempos de retenção relativos em comparação com os obtidos m GC-MS, justificada pela utilização de colunas com diâmetros internos e comprimentos diferentes, apesar da mesma fase estacionária.

Na Figura 31 é apresentado um cromatograma resultante da injeção de uma mistura com os inseticidas estudados numa concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 31 – Cromatograma de GC-ECD de uma mistura dos compostos organofosforados em estudo**

(1) Dimetoato; (2) diazinão; (3) pirimifos-metilo; (4) malatião; (5) clorpirifos; (6) paratião; (8) clorfenvinfos, isômero *E*; (9) clorfenvinfos, isômero *Z*; (10) quinalfos; (11) etião; e (12) fosadona.

Na Figura 31 registou-se ainda que, um pouco à imagem do que acontece com o fentião, o detetor não é tão sensível ao pirimifos-metilo, como aos restantes inseticidas, embora este seja perfeitamente identificado a concentrações de 5 µg/mL, valor com relevância toxicológica.

## 4.2 Desenvolvimento do Procedimento de Extração em Sangue

Num primeiro momento foi realizada uma comparação entre amostras de sangue, fortificadas e não fortificadas, preparadas de acordo com os dois procedimentos de extração com as colunas HLB (*HLB\_Park* e *HLB\_Raposo*) e *Sep-Pak\_10*. As médias das áreas dos picos dos diferentes IOFs de amostras fortificadas preparadas com as colunas HLB foram muito inferiores àsquelas resultantes de extrações com colunas *Sep-Pak*® C18 (Figura 32). As médias das áreas dos picos obtidos em ECD para as amostras preparadas com as colunas HLB corresponderam a menos de 20% (19,8% para *HLB\_Park* e 18,0% para *HLB\_Raposo*) relativamente à registada com o procedimento *Sep-Pak\_10*. No entanto, o decréscimo das áreas dos picos de dimetoato não foi tão acentuado, e verificou-se que as áreas para este pesticida corresponderam a 43,3 (procedimento *HLB\_Park*) e a 59,6% (*HLB\_Raposo*). Este comportamento pode eventualmente ser explicado por uma utilização de solventes de diluição das amostras de sangue e colunas de SPE das amostras com expressão diferente na extração dos inseticidas.

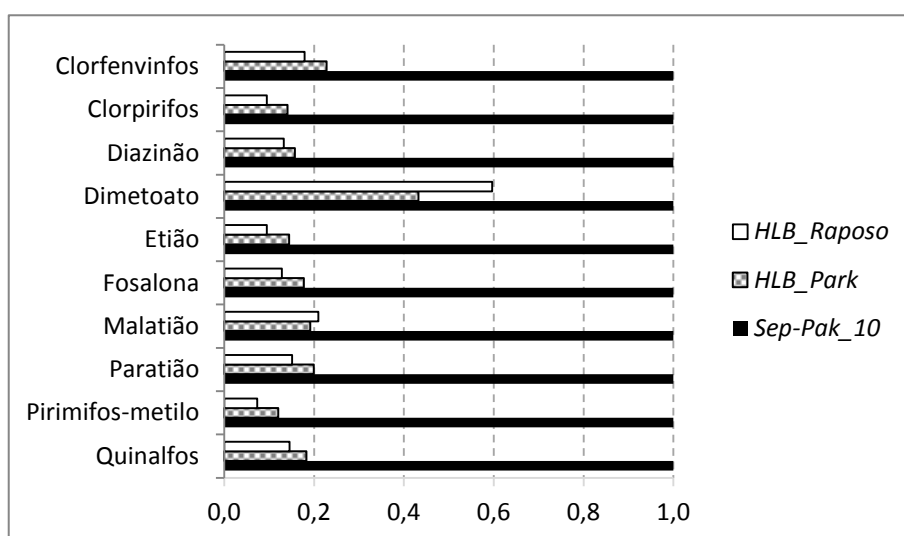
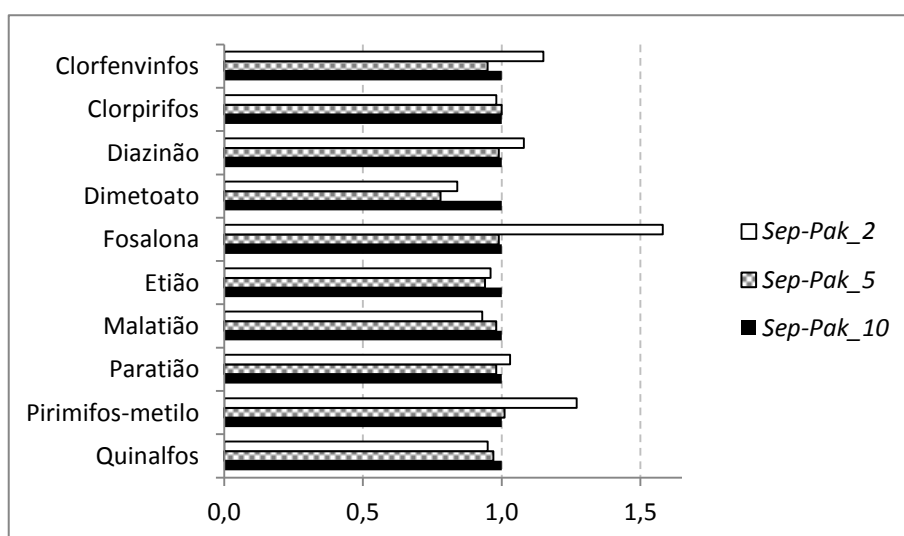


Figura 32 – Relação entre as áreas obtidas em GC-ECD das amostras fortificadas preparadas com os procedimentos *HLB\_Raposo*, *HLB\_Park* e *Sep-Pak\_10*



As amostras foram também analisadas em GC-MS-SIM para averiguar a presença de possíveis interferências nos cromatogramas dos iões dos inseticidas estudados. Não se registou qualquer interferência nos cromatogramas das amostras preparadas com os três procedimentos, com uma exceção. Verificou-se que os cromatogramas dos iões da fosadona, em particular dos iões  $m/z$  182 e 121 (os mais abundantes), de amostras fortificadas e não fortificadas preparadas com os dois procedimentos com colunas HLB apresentavam picos interferentes. Assim, foi escolhido o procedimento com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> C18 em detrimento dos procedimentos com colunas HLB.

Posteriormente foram comparados os procedimentos de extração com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> C18 usando diferentes volumes de cada um dos solventes empregues no condicionamento, nomeadamente 10, 5 e 2 mL (Figura 33). Observou-se que os valores médios das áreas dos picos das amostras preparadas com os procedimentos *Sep-Pak\_5* e *Sep-Pak\_2* eram próximos das obtidas com *Sep-Pak\_10* (o valor médio da razão entre médias de *Sep-Pak\_5* e *Sep-Pak\_10* foi 95,7, e de 107,6% entre *Sep-Pak\_2* e *Sep-Pak\_10*). Registaram-se diferenças em alguns compostos, nomeadamente para o dimetoato, fosadona e pirimifos-metilo, mas dado que não se evidenciou que qualquer dos métodos com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> C18 era superior aos demais, o procedimento *Sep-Pak\_2* foi selecionado para validação uma vez que, devido à utilização de volumes menores, há uma redução de custos com solventes e do tempo de preparação das amostras (uma mais valia tendo em vista a sua possível integração na rotina laboratorial).



**Figura 33 – Relação entre as áreas obtidas em GC-ECD das amostras fortificadas preparadas com os procedimentos *Sep-Pak\_10*, *Sep-Pak\_5* e *Sep-Pak\_2***

### 4.3 Desenvolvimento do Procedimento de Extração em Conteúdo Gástrico

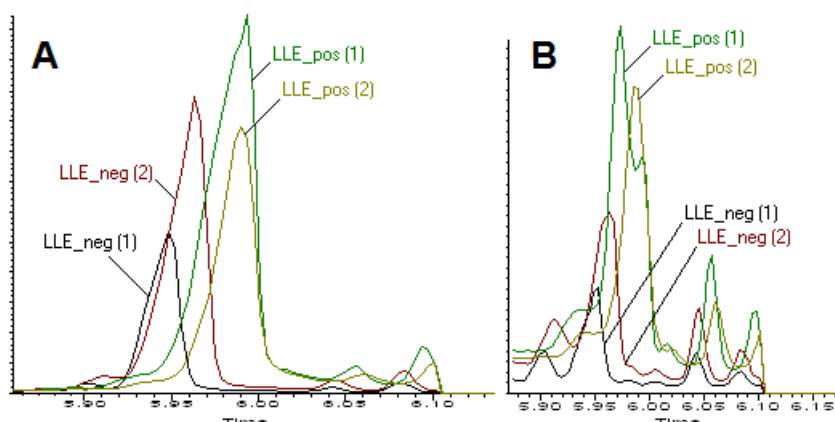
Uma vez que o procedimento de ensaio em sangue já estava desenvolvido, numa primeira fase, foram testadas as mesmas condições com amostras de conteúdo gástrico. Durante a extração com o procedimento “*SPE*”, entre as quatro amostras preparadas, uma coluna colmatou, e em outras duas o mesmo esteve próximo de acontecer, o que torna este procedimento inadequado para aplicar na rotina laboratorial.

De seguida, foi testado o procedimento que consistia num único passo de extração líquido-líquido com éter dietílico. Após a análise de amostras fortificadas e não fortificadas, em duplicado, verificou-se que o procedimento “*LLE*” não foi eficiente na remoção de interferentes das mesmas, uma vez que na comparação entre cromatogramas adquiridos em modo SIM não foi possível diferenciar os picos de alguns dos iões seleccionados para compostos em estudo entre o grande número de sinais muito intensos de interferentes também presentes nos cromatogramas de amostras não fortificadas. Não se conseguiu distinguir os picos dos iões  $m/z$  153 e 79 do fentião, dos iões  $m/z$  186 e 139 do paratião, e do ião  $m/z$  154 e 121 da fosfalona, entre os vários picos com intensidades muito elevadas devidos a compostos da matriz. No caso do dimetoato, malatião, clorfenvinfos e etião não foi possível detetar os picos dos analitos com base nos seus iões seleccionados para o tempo de retenção esperado. A título de exemplo (Figura 34), não se consegue diferenciar os cromatogramas dos iões 87 e 93 (característicos do dimetoato) em amostras fortificadas e de amostras não fortificadas preparadas com este procedimento, *LLE\_pos* e *LLE\_neg*, respetivamente.

A par da dificuldade de identificação dos analitos com base nos iões, a remoção ineficiente de contaminantes significa também a introdução de quantidades elevadas de resíduos no equipamento, exigindo intervalos menores entre operações de manutenção, como trocas de liner do injetor ou limpeza da fonte de ionização. Isto tornou o procedimento inadequado para o propósito.

De seguida, testou-se um procedimento que resultava da junção dos dois anteriores, isto é, que consistia num passo de *LLE* seguido de *SPE*. Após a extração líquido-líquido o solvente foi evaporado, e o extrato retomado com vários solventes tendo em vista a pesquisa de um que tirasse partido das diferentes solubilidades dos analitos em estudo e

dos componentes presentes na matriz, de modo a obter um eluato de SPE com os analitos, mas sem interferentes provenientes da matriz.

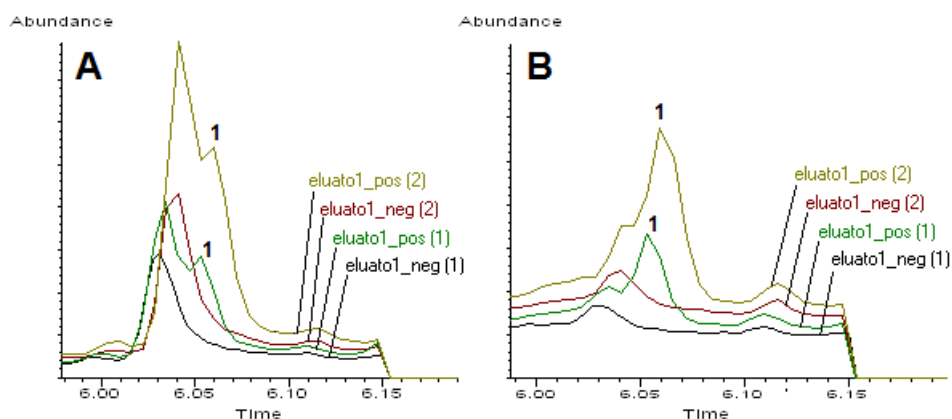


**Figura 34 – Cromatogramas dos íões m/z 87 (A) e 93 (B) de amostras fortificadas e não fortificadas preparadas com o procedimento *LLE* (GC-MS-SIM)**

Na análise dos eluatos\_2 de todos os procedimentos testados voltou a não ser possível diferenciar os picos de alguns inseticidas entre os picos de interferentes provenientes da matriz com base em alguns íões. Não se conseguiu diferenciar os picos dos íões m/z 127 e 158 do malatião, os íões m/z 79 e 153 do fentião, e o íão m/z 154 da fosadona, com qualquer destes procedimentos. Não foi ainda possível detetar o dimetoato partir dos seus íões.

Na análise dos eluatos\_1 de amostras fortificadas, em comparação com os eluatos\_2, observaram-se níveis de ruído e linhas de base mais baixos nos cromatogramas dos primeiros quando o procedimento adotado foi *LLE\_ACN\_SPE*. Não se verificou o mesmo com os eluatos\_1 dos procedimentos *LLE\_Hex\_SPE*, *LLE\_Éter\_SPE* e *LLE\_MetOH\_SPE*, em que o nível de ruído foi semelhante ou superior. Nas amostras preparadas de acordo com o procedimento *LLE\_Água\_SPE* as linhas de base foram também mais baixas mas não se observaram quaisquer picos nos cromatogramas dos eluatos\_1. Isto sugere que os analitos ficaram totalmente retidos na coluna de SPE, sendo posteriormente eluídos para o eluato\_2, explicado pelos valores elevados de  $K_{ow}$  dos pesticidas. No caso do procedimento *LLE\_ACN\_SPE* já foi possível detetar os picos dos inseticidas com todos os íões selecionados sem qualquer interferência proveniente da matriz, com exceção do dimetoato, como mostra a Figura 35. Dado este comportamento, foi avaliada a extração com concentrações superiores de pesticidas (10 mg/L, quando até aqui foi 1 mg/L). Aí, foi

possível a identificação inequívoca do dimetoato. Observou-se também que as áreas dos picos nos eluatos\_1 eram aproximadamente 4,2 vezes maiores em relação às dos eluatos\_2.

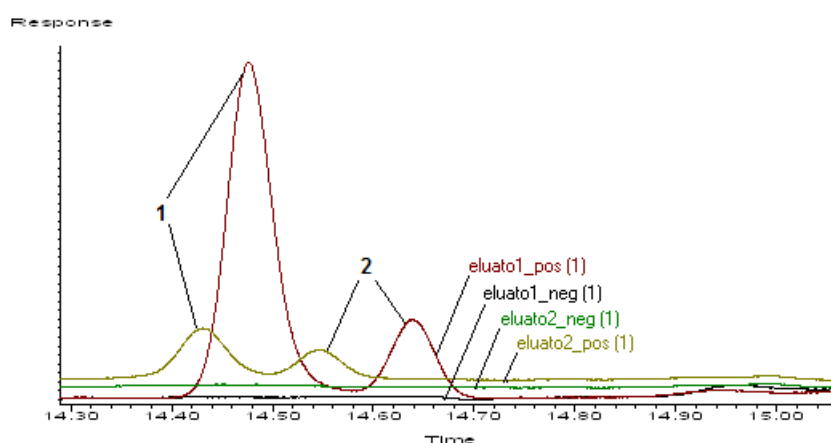


**Figura 35 – Cromatogramas dos iões  $m/z$  87 (A) e 93 (B) de amostras fortificadas e não fortificadas, preparadas com *LLE\_ACN\_SPE* (GC-MS-SIM)**

(1) Dimetoato.

Nos eluatos\_1 preparados com os restantes procedimentos não foi possível detetar os picos a partir dos iões com os quais também não se tinha conseguido detetar nos eluatos\_2, como referido dois parágrafos antes.

No estudo dos eluatos\_1 e eluatos\_2 em GC-ECD foi possível detetar e identificar claramente os inseticidas nas amostras fortificadas sem interferências da matriz, e observar que as áreas dos picos eram maiores nas amostras fortificadas dos eluatos\_1 em comparação com as dos eluatos\_2 (Figura 36), como referido anteriormente e como mostra a Figura abaixo.



**Figura 36 – Cromatogramas dos eluatos\_1 e eluatos\_2 de amostras preparadas com o procedimento *LLE\_ACN\_SPE* (GC-ECD)**

(1) Dimetoato e (2) Diazinão.

Assim, o método de extração de IOFs em conteúdo gástrico avaliado na validação seguiu o procedimento *LLE\_ACN\_SPE*.

#### 4.4 Validação dos Procedimentos de Ensaio

Os parâmetros estudados para cada procedimento de ensaio dependem de se o procedimento em causa é de rastreio qualitativo, de confirmação qualitativa dos casos positivos obtidos no rastreio, ou de quantificação dos casos positivos confirmados (Tabela 10 [138]).

**Tabela 10 – Parâmetros de validação em função do propósito de método**

Parâmetros	Métodos		
	Rastreio	Confirmação	Quantificação
Arrastamento	x	x	x
Confirmação da identidade	x	x	x
Eficiência de extração		x	x
Seletividade	x	x	x
Exatidão			x
Gama de trabalho			x
Limite de deteção	x	x	x
Limite de quantificação			x
Linearidade			x
Robustez	x	x	x

Os procedimentos de ensaio em amostras de conteúdo foram avaliados para rastreio qualitativo ou confirmação qualitativa, enquanto os procedimentos em amostras de sangue total foram validados para quantificação. Uma vez que os parâmetros necessários para validar um procedimento para rastreio ou confirmação integram os parâmetros necessários para validar um procedimento para quantificação, um procedimento de quantificação é também considerado válido para rastreio ou confirmação.

##### 4.4.1 Seletividade e Confirmação da Identidade

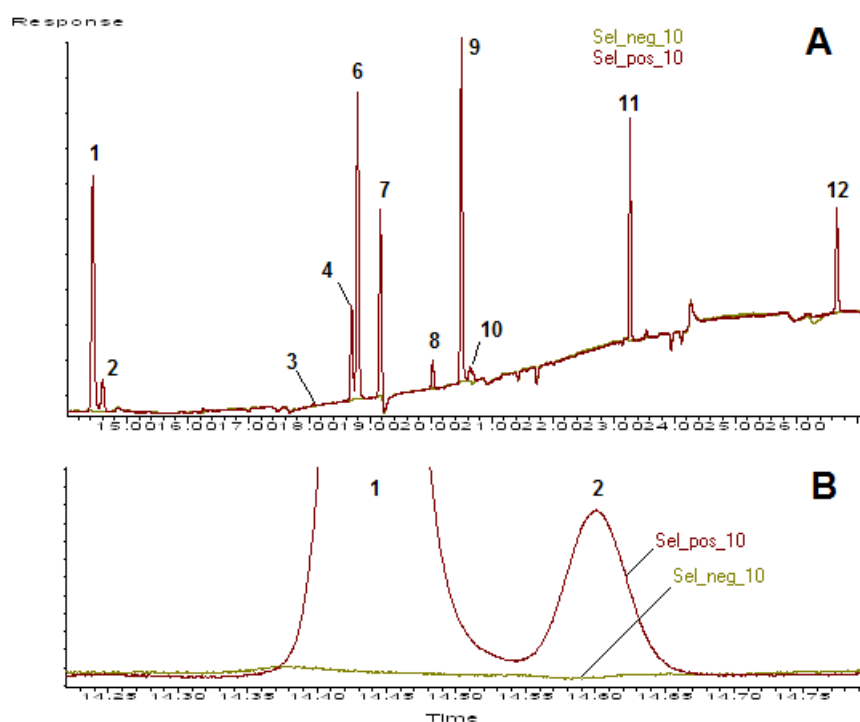
###### *Amostras de Sangue*

Num contexto laboratorial, a avaliação da seletividade é realizada pela comparação entre os resultados obtidos na análise de amostras brancas não fortificadas das matrizes pretendidas com aqueles obtidos através da análise de amostras das mesmas matrizes fortificadas com os analitos a determinar, com o objetivo de identificar eventuais sinais interferentes que, de algum modo, condicionem os resultados obtidos nas amostras

fortificadas [6, 8]. São utilizadas no mínimo dez amostras fortificadas e dez não fortificadas [138].

Para o estudo deste parâmetro em amostras de sangue preparou-se uma mistura de 30 mL a partir de seis amostras de sangue de homens e mulheres, de sangue periférico ou cardíaco, obtidas *post-mortem*, referentes a processos já analisados no STF-N que respeitavam os prazos legais para a sua eliminação, e cujos resultados, analisados por outros procedimentos analíticos, foram negativos para o grupo de compostos selecionado.

A comparação de cromatogramas (Figura 37) de amostras não fortificadas e de amostras fortificadas obtidos por GC-ECD mostra a inexistência de interferentes provenientes da matriz, dado que os picos observados nos cromatogramas de amostras não fortificadas não possuem tempos de retenção coincidentes com os picos dos inseticidas organofosforados.



**Figura 37 – Cromatogramas de uma amostra não fortificada de sangue (Sel\_neg\_10) e uma amostra fortificada (Sel\_pos\_10) por GC-ECD: Vista completa dos cromatogramas (A) e Aproximação (B)**

(1) Dimetoato; (2) diazinão; (3) pirimifos-metilo; (4) malatião; (6) clorpirifos; (7) paratião; (8) clorfenvinfos, isômero *E*; (9) clorfenvinfos, isômero *Z*; (10) quinalfos; (11) etião; e (12) fosfalona.

Na injeção das amostras referidas não se obtiveram falsos positivos ou falsos negativos, numa avaliação que teve por base os seguintes requisitos [152]:

- o tempo de retenção (t.r.) não diferiu mais que 2 % relativamente a um controlo positivo ou mais do que  $\pm 0,1$  minutos (o menor dos dois);
- o tempo de retenção relativo (t.r.r.) não diferiu mais do que 1 % relativamente a um controlo positivo;
- o valor da razão sinal/ruído para o composto foi superior a 3.

Na Figura 38 são apresentados os resultados obtidos para uma das amostras usadas neste estudo, de acordo com a folha de avaliação da confirmação da identidade com base no tempo de retenção e no tempo de retenção relativo [153].

Amostra:	EspSel_P_01		Controlo: EspSel_P_02		Padrão Interno Etião		Operador: NV		
Série	EspSel		Observações: Especificidade e Seletividade PE-STF-N-201						
CONTROLO									
	EspSel_P_02		tr PI		23,29				
Composto	Dimetoato	Diazinão	Pririmifos-metil	Malatião	Clorpirifos	Paratião	Clorfenvinfos	Quinalfos	Fosalona
t.r.	14,46	14,63	18,09	18,72	18,81	19,19	20,53	20,66	26,69
t.r.r.	0,62	0,63	0,78	0,80	0,81	0,82	0,88	0,89	1,15
t.r. Critério de Aceitação	0,1 abs								
Lim. Inf. t.r.	14,358	14,531	17,990	18,622	18,713	19,086	20,426	20,557	26,593
Lim. Sup. t.r.	14,558	14,731	18,190	18,822	18,913	19,286	20,626	20,757	26,793
Lim. Inf. t.r.r.	0,614	0,622	0,769	0,796	0,800	0,815	0,872	0,878	1,135
Lim. Sup. t.r.r.	0,627	0,634	0,784	0,812	0,816	0,832	0,890	0,896	1,157
Composto									
t.r.	<div></div>								
t.r.r.									
Lim. Inf. t.r.									
Lim. Sup. t.r.									
Lim. Inf. t.r.r.									
Lim. Sup. t.r.r.									
AMOSTRA									
	EspSel_P_01		tr PI		23,297				
Composto	Dimetoato	Diazinão	Pririmifos-metil	Malatião	Clorpirifos	Paratião	Clorfenvinfos	Quinalfos	Fosalona
t.r.	14,46	14,64	18,09	18,73	18,82	19,19	20,53	20,66	26,70
	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
t.r.r.	0,62	0,63	0,78	0,80	0,81	0,82	0,88	0,89	1,15
	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme

**Figura 38 – Excerto da folha de confirmação da identidade dos diferentes inseticidas em amostras de sangue por GC-ECD**

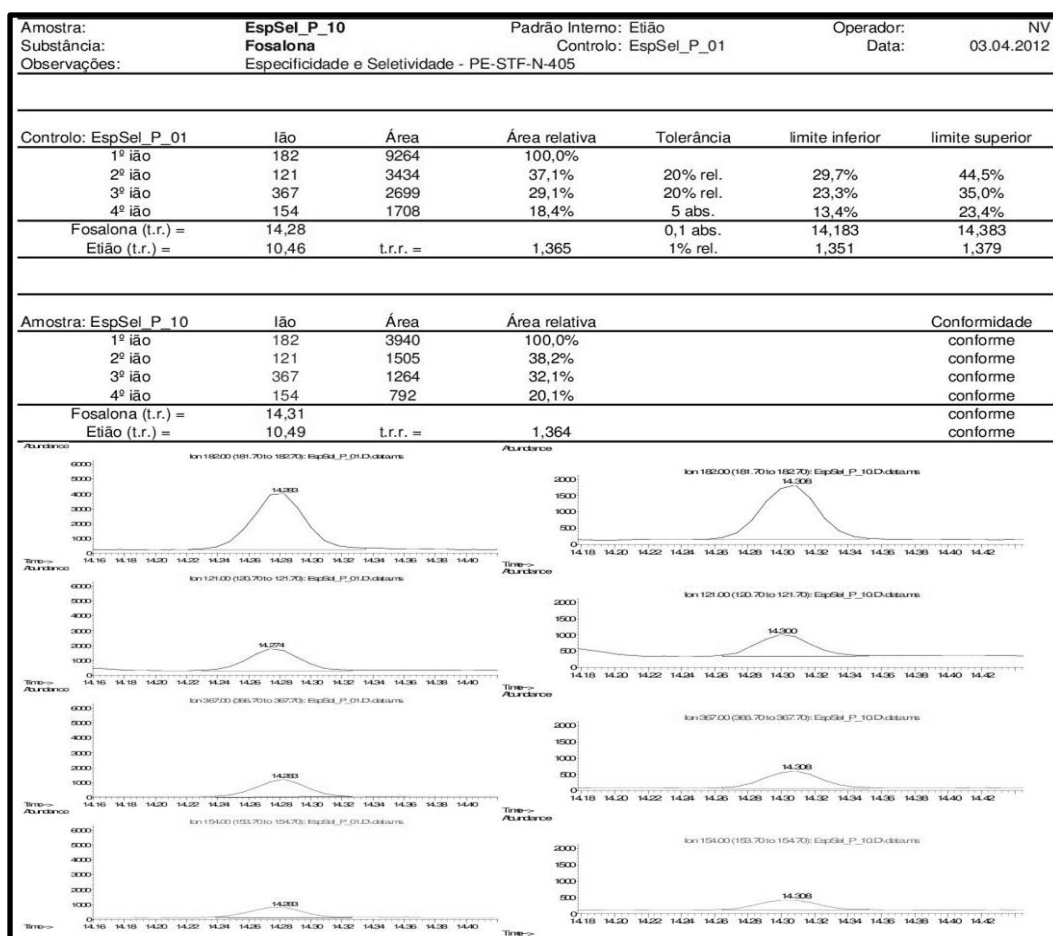
Em GC-MS, o conjunto de critérios diferiu relativamente ao apresentado acima devido ao método de deteção:

- o tempo de retenção (t.r.) não diferiu mais que 2 % relativamente a um controlo positivo ou mais do que  $\pm 0,1$  minutos (o menor dos dois);
- o tempo de retenção relativo (t.r.r.) não diferiu mais do que 1 % relativamente a um controlo positivo;
- estavam presentes os iões escolhidos no espectro de fragmentação;
- o valor da razão sinal/ruído para o ião menos intenso foi superior a 3;
- as intensidades relativas estavam de acordo com os parâmetros apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11 – Intervalos de tolerância das variações para as intensidades relativas dos íons em GC-MS**

Abundâncias Relativas (% do pico mais intenso)	Tolerâncias
> 50	± 10% (absoluto)
25 a 50	± 20% (relativo)
5 a < 25	± 5% (absoluto)
< 5	± 50% (relativo)

Atendendo a estes critérios, entre as 10 amostras estudadas com os 10 inseticidas, apenas houve um falso negativo por incumprimento do primeiro critério apresentado: a diferença entre os valores de t.r. do pico de quinalfos numa das amostras e do pico de quinalfos usado como controlo foi superior a 0,1 minutos. No entanto, dado que o procedimento técnico de validação em vigor no STF-N [138] prevê a aceitação de até 10% de falsos negativos considera-se que este parâmetro preenche esse requisito. Na Figura 39 são apresentados os resultados da confirmação da identidade da fosadona uma amostra, de acordo com a folha de confirmação qualitativa [154].



**Figura 39 – Excerto da folha de confirmação da identidade da fosadona numa amostra de sangue por GC-MS-SIM**



Por fim, é ainda estabelecido no procedimento de validação [138] a necessidade de determinar o Coeficiente de Variação (CV) das razões entre a Área do Analito e Área do Padrão Interno ( $A_A/A_{PI}$ ) quando se pretende validar o procedimento tendo em vista a análise quantitativa. É ainda estabelecido que o CV deve ser inferior a 20%. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12. Dada a obtenção de valores superiores a 20%, foram identificados possíveis valores anómalos de  $A_A/A_{PI}$ , os quais foram confirmados e rejeitados por realização do teste de Grubbs. Em todos esses casos, após a rejeição dos valores anómalos, os valores de CV encontravam-se dentro do critério de aceitação e, por isso, considera-se este parâmetro validado.

**Tabela 12 – Valores de coeficiente de variação de  $A_A/A_{PI}$  obtido em amostras para sangue**

Inseticidas	CV (%)	
	GC-ECD	GC-MS
Clorfenvinfos	8,51	9,91
Clorpirifos	6,76	10,45
Diazinão	8,37	9,67
Dimetoato	19,68*	12,29
Fentião	n/a	8,48
Fosalona	10,28	10,90
Malatião	9,89*	10,69
Paratião	9,84	9,58
Pirimifos-metilo	18,12	9,38
Quinalfos	18,53	16,63*

Nota: os casos em que foram rejeitados valores anómalos estão assinalados com um asterisco (\*)  
n/a – não aplicável porque o detetor não é sensível para a gama em estudo

### ***Amostras de Conteúdo Gástrico***

No estudo em conteúdo gástrico, foram preparadas dez alíquotas brancas não fortificadas e dez alíquotas fortificadas a 10 ppm de cada inseticida, incluindo o padrão interno. Tal como para sangue, as amostras obtidas *post-mortem*, provieram de casos já analisados no STF-N que respeitavam os prazos legais para a sua eliminação, e cujos resultados, analisados por outros procedimentos analíticos, foram negativos para o grupo de compostos selecionado. Foram também preparadas duas amostras fortificadas e duas não fortificadas em que o conteúdo gástrico foi substituído pelo mesmo volume de água acidificada com ácido clorídrico e com um pH final de 4, para usar como controlo de qualidade interno.

Na análise dos resultados com recurso às folhas de avaliação da conformidade com base no tempo de retenção e no tempo de retenção relativo [153] e folha de confirmação qualitativa [154], com exceção de um caso, não se obteve nenhum resultado falso positivo ou falso negativo, quer em GC-ECD, quer em GC-MS-SIM. A exceção foi um falso negativo para o dimetoato em GC-MS-SIM, devido à intensidade relativa dos iões.

Por se tratar de metodologias de rastreio e confirmação, não foi necessário estudar o Coeficiente de Variação neste contexto.

#### 4.4.2 Gama de Trabalho e Linearidade

##### *Amostras de Sangue*

Dada a elevada disparidade de valores registados em intoxicações fatais apresentados na Tabela 2, chegando a atingir mais de três ordens de grandeza entre o valor mais baixo e o mais alto, na definição da gama de trabalho foi inicialmente escolhido um intervalo entre 50 e 5000 ng/mL para todos os inseticidas. Assim, uma vez que se pretendia implementar o método na rotina do laboratório, assegurou-se que os valores mais baixos registados estavam inseridos na gama de trabalho. Nos casos em que o inseticida se encontrasse em concentrações acima do limite superior da gama de trabalho a conclusão sobre qual o agente responsável pela morte não seria afetada, podendo ser suficiente para a conclusão do processo médico-legal a observação de que determinado inseticida se encontra presente numa concentração superior a um determinado limite, definido com base em valores fatais conhecidos e registados. Há ainda a acrescentar que a determinação forense da presença destes pesticidas é realizada por indicação do médico patologista após a autópsia, em que o médico pode detetar a cor ou o odor característico de alguns pesticidas, quando estes se encontram no conteúdo gástrico [44, 70].

Uma vez escolhida a gama de trabalho foi utilizado o “*método dos mínimos quadrados*” para estimar os parâmetros de um modelo por regressão linear simples, em que de acordo com os critérios internos do STF-N é aceite um valor absoluto do coeficiente de correlação ( $r$ ) superior a 0,99 para um intervalo de confiança de 95% [138]. Contudo, valores de  $|r|$  muito próximos da unidade não significam que o melhor modelo é o linear simples [155], uma vez que na regressão pelo método dos mínimos quadrados, a redução de resíduos nas concentrações mais elevadas tem mais impacto na minimização da soma

dos quadrados. Consequentemente, as concentrações muito pequenas são negligenciadas. Deste modo, um pré-requisito para a realização de regressão linear simples é o emprego de uma gama de concentrações que apresentem variabilidade comparável, também denominada por homogeneidade de variâncias ou homocedasticidade [137]. O Guia RELACRE 13 [144], em linha com a norma ISO 8466-1 [156], propõe a realização do teste estatístico  $PG$  para a verificação da homocedasticidade entre o primeiro e o último nível da curva de calibração [138]:

$$PG = \frac{s_{sup}^2}{s_{inf}^2} \quad \text{ou} \quad PG = \frac{s_{inf}^2}{s_{sup}^2} \quad (\text{tal que } PG \geq 1) \quad (\text{equação 1})$$

em que  $s_{inf}^2$  e  $s_{sup}^2$  correspondem aos valores de variância nos limites inferior e superior da gama, respetivamente. Posteriormente é realizada a comparação dos valores obtidos com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher ( $F_{crit}$ ).

Se  $PG < F_{crit}$ , as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada. Nas situações em que  $PG > F_{crit}$  as diferenças entre as variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que tal deixe de se verificar. Na Tabela 13 encontram-se os valores obtidos no estudo da homocedasticidade. Como referido anteriormente, na determinação por GC-ECD o fentião não foi considerado e a gama de calibração do pirimifos-metilo foi encurtada para 500-5000 ng/mL, devido à baixa sensibilidade do detetor, sendo que o primeiro não foi detetado no cromatograma em amostras fortificadas a 5000 ng/mL e o segundo a 50 ng/mL.

**Tabela 13 – Valores de variância e do teste PG obtidos no estudo da homocedasticidade**

Inseticidas	GC-ECD			GC-MS		
	$s_{inf}^2$	$s_{sup}^2$	$PG$	$s_{inf}^2$	$s_{sup}^2$	$PG$
Clorfenvinfos	$3,35 \times 10^{-6}$	$7,80 \times 10^{-2}$	23285,36	$3,06 \times 10^{-7}$	$1,98 \times 10^{-2}$	64732,91
Clorpirifos	$2,84 \times 10^{-6}$	$5,06 \times 10^{-2}$	17821,80	$2,63 \times 10^{-7}$	$5,66 \times 10^{-3}$	21504,95
Diazinão	$1,65 \times 10^{-7}$	$7,01 \times 10^{-4}$	4242,90	$3,17 \times 10^{-7}$	$8,27 \times 10^{-3}$	26063,62
Dimetoato	$4,01 \times 10^{-7}$	$1,54 \times 10^{-2}$	38323,00	$4,47 \times 10^{-7}$	$1,68 \times 10^{-2}$	37686,66
Fentião	n/a	n/a	n/a	$2,04 \times 10^{-6}$	$4,36 \times 10^{-2}$	21357,13
Fosalona	$4,22 \times 10^{-6}$	$6,87 \times 10^{-2}$	16293,82	$3,09 \times 10^{-6}$	$2,65 \times 10^{-2}$	85687,83
Malatião	$4,60 \times 10^{-7}$	$7,30 \times 10^{-3}$	15862,24	$5,01 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-2}$	26417,26
Paratião	$2,77 \times 10^{-6}$	$1,58 \times 10^{-2}$	5689,69	$8,38 \times 10^{-8}$	$6,99 \times 10^{-3}$	83376,13
Pirimifos-metilo	$2,07 \times 10^{-7}$	$5,45 \times 10^{-5}$	263,07	$8,37 \times 10^{-7}$	$2,40 \times 10^{-2}$	28627,10
Quinalfos	$1,22 \times 10^{-8}$	$2,67 \times 10^{-4}$	21936,95	$4,47 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-2}$	28053,62

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível para a gama em estudo

Nota: as gamas de trabalho em estudo estavam compreendidas entre 50 e 5000 ng/mL para todos os compostos, exceto para o pirimifos-metilo por GC-ECD, entre 500 e 5000 ng/mL.

Os resultados obtidos com 10 réplicas (Tabela 13) mostraram que as variâncias eram significativamente diferentes,  $F_{crit} = 3,18$  [157] (9 graus de liberdade no denominador e no numerador). Foram então estudadas gamas de trabalho mais estreitas e as variâncias foram também significativamente diferentes (dados apresentados em **Anexo B**). Assim, numa situação de heterocedasticidade, vários autores propõem a utilização de diferentes modelos de regressão para ultrapassar esta dificuldade, tais como regressão linear ponderada, regressão polinomial ou a transformação [33, 155, 158]. O princípio da regressão linear ponderada consiste na atribuição de maior importância aos pontos experimentais com menor variância, normalmente os pontos no limite inferior da gama de trabalho. Este modelo é aplicado numa situação em que o coeficiente de variação é constante ao longo da gama, isto é, o desvio-padrão aumenta proporcionalmente com a concentração. Uma vez que os coeficientes de variação de  $A_A/A_{PI}$  nos limites inferior e superior ( $CV_{inf}$  e  $CV_{sup}$ , respetivamente) das gamas de trabalho são muito próximos (Tabela 14), considerou-se que o sejam também ao longo da gama e, por isso, foi realizada a regressão linear ponderada.

**Tabela 14 – Valores dos coeficientes de variação de  $A_A/A_{PI}$  nos limites da gama de trabalho**

Inseticidas	GC-ECD		GC-MS	
	$CV_{inf}$ (%)	$CV_{sup}$ (%)	$CV_{inf}$ (%)	$CV_{sup}$ (%)
Clorfenvinfos	5,86	7,51	5,10	7,17
Clorpirifos	4,26	6,80	5,42	6,78
Diazinão	9,21	7,34	6,03	8,25
Dimetoato	9,84	7,84	6,72	7,68
Fentião	n/a	n/a	8,30	7,39
Fosalona	9,29	6,05	4,16	7,30
Malatião	7,50	7,11	6,71	7,26
Paratião	8,75	7,24	6,12	9,16
Pirimifos-metilo	9,83	9,18	9,80	9,40
Quinalfos	8,97	7,93	5,94	6,60

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível para a gama em estudo

Se o erro relativo médio aumentar ou diminuir ao longo da gama de trabalho o conjunto de dados poderá ajustar-se melhor a um modelo não-linear, em que o mais simples é o modelo quadrático. A aplicação de modelos mais complexos é encarada com cautela pois é pretendido que em métodos analíticos o sinal varie linearmente com a concentração do analito.

Os fatores de ponderação,  $w_i$ , mais comuns  $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/\sqrt{x}$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$  e  $1/\sqrt{y}$ , são usados para determinar os parâmetros das curvas de calibração a partir das equações [158, 159]:

$$b = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{equação 2})$$

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{equação 3})$$

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (\text{equação 4})$$

em que  $w_i$  é o fator de ponderação escolhido e  $(x_i, y_i)$  é o par de dados, onde  $x_i$  é a concentração e  $y_i$  o valor da razão entre as áreas do analito e do padrão interno,  $A_A/A_{PI}$ . Estes parâmetros da regressão linear podem ser estimados a partir de equações adaptadas destas, em que é removido o fator de ponderação  $w_i$  de todos os somatórios e  $\sum w_i$  é substituído por  $n$  (número de níveis estudados) [158, 159].

Uma vez estimados os parâmetros da curva (**Anexo C**) com os diferentes fatores de ponderação acima apresentados, foi determinada a concentração ( $C_{det}$ ) para os diferentes valores de  $y_i$ , e para cada fator de ponderação, assim como a soma dos erros relativos percentuais,  $\sum(ER\%)$ , para escolher qual o melhor fator. O erro relativo percentual compara a concentração determinada ( $C_{det}$ ) por regressão linear ponderada com aquela que era esperada, a concentração nominal ( $C_{nom}$ ):

$$ER\% = \frac{C_{det} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

O modelo que apresentar a menor soma de  $ER\%$  é o escolhido. Na Tabela 15 são apresentados os valores encontrados das somas dos erros relativos percentuais para os diferentes fatores de ponderação estudados para cada composto, quer por GC-ECD, quer por GC-MS-SIM.

De acordo com os resultados obtidos, a menor soma de erros relativos foi apresentada pela regressão linear com o fator de ponderação  $1/x^2$  para praticamente todos os compostos, na análise por GC-ECD e por GC-MS-SIM. A exceção foi o pirimifos-

metilo, em GC-ECD com a gama mais curta, para o qual a menor soma dos erros relativos percentuais correspondeu ao uso do fator  $1/y^2$ . Neste caso, com o fator  $1/x^2$  obteve-se a segunda menor soma. No trabalho de Raposo *et al.* [33] o fator de ponderação  $1/x^2$  foi o escolhido para 6 dos 8 inseticidas estudados, em linha com os resultados aqui apresentados. Também de acordo com Almeida *et al.* [158] na maioria dos métodos em que o desvio-padrão varia proporcionalmente com a concentração o fator de ponderação escolhido é  $1/x^2$ . A regressão linear simples foi a que apresentou a maior acumulação de erros relativos, o que reforça a necessidade de empregar fatores de ponderação aquando da preparação de curvas de calibração. Fruto da menor relevância dada às concentrações mais baixas na regressão linear simples, o maior contributo para a  $\sum(ER\%)$  advém destas. Assim, a calibração linear ponderada permite a utilização de gamas de trabalho maiores com um grau de fidelidade superior relativamente à calibração linear simples [158].

**Tabela 15 – Valores das somas dos erros relativos percentuais obtidos com os vários fatores de ponderação**

$w_i$		1	$1/x$	$1/x^2$	$1/\sqrt{x}$	$1/y$	$1/y^2$	$1/\sqrt{y}$
<b>GC-ECD</b> (%)	Clorfenvinfos	234,82	67,53	55,97	119,45	67,71	69,06	119,69
	Clorpirifos	215,97	75,76	57,70	126,54	81,49	63,04	132,82
	Diazinão	75,63	78,41	67,74	97,22	84,74	81,74	106,08
	Dimetoato	246,59	76,53	68,38	126,92	76,41	89,12	121,59
	Fosalona	732,34	190,46	142,64	365,70	182,25	190,15	344,77
	Malatão	497,42	147,25	119,78	271,66	150,83	175,71	274,01
	Paratão	271,08	86,01	67,27	150,53	92,08	80,65	158,18
	Pirimifos-metilo	34,35	31,25	27,99	32,81	30,42	26,93	32,35
	Quinalfos	371,26	108,76	89,40	198,98	104,17	115,32	192,59
	$\sum(\sum(ER\%))$	2228,67	718,66	583,19	1243,83	720,89	759,62	1229,58
<b>GC-MS</b> (%)	Clorfenvinfos	498,82	152,60	128,95	278,80	151,32	197,08	269,79
	Clorpirifos	443,82	114,28	88,36	223,89	120,65	100,37	228,98
	Diazinão	298,73	127,21	108,70	197,61	135,86	133,49	205,70
	Dimetoato	360,01	131,96	114,00	220,59	130,59	162,96	214,00
	Fentão	569,42	164,12	136,42	306,72	162,64	186,38	298,64
	Fosalona	563,52	179,00	147,52	320,54	180,55	202,10	315,11
	Malatão	612,41	167,06	127,60	299,95	165,28	198,43	296,17
	Paratão	297,61	98,24	89,89	172,03	99,34	129,65	168,91
	Pirimifos-metilo	130,51	71,58	65,81	96,89	72,63	81,10	99,59
	Quinalfos	550,98	157,32	131,17	297,64	159,04	204,26	295,26
	$\sum(\sum(ER\%))$	4325,83	1363,38	1138,43	2414,67	1377,89	1595,81	2392,15

Nota: as gamas de trabalho em estudo estavam compreendidas entre 50 e 5000 ng/mL para todos os compostos, exceto para o pirimifos-metilo por GC-ECD, 500 e 5000 ng/mL.

Dado que o fator de ponderação  $1/x^2$  apresentou a menor soma dos  $ER\%$  para quase todos os IOFs refletiu-se no somatório global dos erros,  $\sum(\sum(ER\%))$  (Tabela 15), para os dois conjuntos de pesticidas e, por isso, foi selecionado nas fases seguintes deste trabalho para todos os inseticidas.

#### 4.4.3 Limiares Analíticos

##### *Amostras de Sangue*

Estes parâmetros foram estudados a partir da preparação de curvas de calibração em torno de um valor de LD previsto com base na experiência do STF-N ou dados da literatura, e posteriormente determinados através das seguintes equações:

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{equação 6})$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{equação 7})$$

em que  $b$  é o declive da curva de calibração e  $S_{y/x}$  o desvio-padrão residual da curva de calibração calculado da seguinte forma:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (\text{equação 8})$$

em que  $y_i$  e  $\hat{y}_i$  correspondem aos valores de  $A_A/A_{PI}$  obtido experimentalmente e estimado pela curva de calibração, respetivamente, e  $n$  ao número de níveis de concentração utilizados para delinear a mesma curva.

Apesar de se ter verificado que a calibração ponderada era a mais adequada, os limites foram também estudados com os parâmetros das curvas de calibração linear simples porque, devido ao ‘peso’ acrescido das concentrações mais baixas (na regressão linear ponderada), as concentrações mais elevadas são, até certo ponto, menosprezadas nos parâmetros de dispersão determinados. Deste modo, os resultados obtidos para os limiares analíticos não são muito diferentes daqueles determinados com recurso apenas a concentrações baixas [137]. Acresce ainda que a utilização de uma gama de concentrações apertada (entre 44 e 66 ng/mL, com a exceção da gama entre 440 e 660 ng/mL para o

pirimifos-metilo em GC-ECD) reduz a heterogeneidade de variâncias entre os valores extremos da gama e, deste modo, a necessidade de utilizar a regressão linear ponderada para determinar os parâmetros da curva de calibração. No entanto, no estudo de LD e LQ a homocedasticidade vs. heterocedasticidade não foi avaliada.

Na Tabela 16 são apresentados os resultados obtidos para os limiares analíticos através da detecção de captura eletrônica e espectrometria de massa após a separação cromatográfica, usando os parâmetros das curvas de calibração da regressão linear simples e da regressão linear ponderada com o fator de ponderação  $1/x^2$ .

Com exceção do pirimifos-metilo por GC-ECD, os valores de LD são muito próximos para os diferentes inseticidas, para as duas técnicas de detecção e usando os parâmetros da calibração linear simples ou ponderada, conforme antecipado acima. Estes variaram entre 2,44 ng/mL (no caso do quinalfos por GC-MS-SIM por calibração linear simples) e 5,19 ng/mL (no caso do quinalfos por GC-ECD por calibração ponderada).

**Tabela 16 – Limites de Detecção e Limites de Quantificação obtidos em amostras de sangue**

Inseticidas	Regressão linear simples				Regressão linear ponderada ( $w = 1/x^2$ )			
	GC-ECD		GC-MS		GC-ECD		GC-MS	
	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
Clorfenvinfos	4,40	13,33	2,96	8,98	4,53	13,72	2,98	9,05
Clorpirifos	4,53	13,73	3,61	10,94	4,50	13,64	3,66	11,10
Diazinão	4,49	13,60	3,14	9,53	4,52	13,69	3,17	9,61
Dimetoato	3,46	10,50	3,22	9,77	3,54	10,74	3,24	9,83
Fentião	n/a	n/a	4,37	13,25	n/a	n/a	4,50	13,63
Fosalona	3,28	9,94	3,09	9,37	3,39	10,26	3,12	9,45
Malatião	4,62	14,01	4,28	12,98	4,81	14,56	4,34	13,14
Paratão	3,54	10,73	3,57	10,82	3,52	10,66	3,54	10,72
Pirimifos-metilo	34,12	103,39	3,15	9,54	35,30	106,98	3,20	9,70
Quinalfos	4,99	15,11	2,44	7,40	5,19	15,73	2,46	7,46

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível para a gama em estudo

O mesmo comportamento foi registado para o LQ dada a relação entre estes dois limiares ( $LQ = \frac{10 \times LD}{3,3}$ ): os valores variaram entre 7,40 e 15,73 ng/mL. Estes valores de LD e LQ são semelhantes ou mais baixos aos limiares encontrados na literatura [40, 66, 69], principalmente se se considerar o volume (0,5 mL neste trabalho vs. 1 ou 2 mL nos



trabalhos acima citados) e o tipo de amostra utilizada (em alguns trabalhos é utilizado soro reduzindo-se desse modo possíveis perdas de analitos por ligação a proteínas). A comprovar a vantagem da utilização do soro existem os trabalhos de Pitarch *et al.* [81, 89].

No entanto, o limite de quantificação pode ser estabelecido acima daquele determinado pelos parâmetros da curva de calibração desde que seja considerado adequado à interpretação toxicológica dos resultados analíticos [138]. Assim, e pelos motivos apresentados aquando da escolha da gama de trabalho, definiu-se o LQ como 50 ng/mL para todos os IOFs para GC-ECD e GC-MS-SIM, com a exceção do pirimifos-metilo em GC-ECD, 500 ng/mL. Por fim, é ainda necessário que o coeficiente de variação de, pelo menos, 5 réplicas independentes fortificados a concentrações definidas como limite de quantificação, seja inferior a 20% [138], tal como se verificou (Tabela 17). O CV foi determinado com base na concentração calculada por regressão linear ponderada das dez amostras estudadas no limite inferior da gama de trabalho, conforme previsto no procedimento técnico de validação [138].

**Tabela 17 – Coeficientes de variação no Limite de Quantificação em amostras de sangue e de conteúdo gástrico**

Inseticidas	CV <sub>Sangue</sub> (%)		CV <sub>Conteúdo Gástrico</sub> (%)	
	GC-ECD	GC-MS	GC-ECD	GC-MS
Clorfenvinfos	4,34	2,95	5,09	13,89
Clorpirifos	4,96	5,19	21,19	25,27
Diazinão	9,20	5,00	18,03	37,46
Dimetoato	4,20	7,72	24,64	47,76
Fentião	n/a	5,42	n/a	44,07
Fosalona	5,17	2,60	8,43	12,27
Malatião	5,49	4,44	14,00	18,67
Paratião	8,91	3,68	20,97	21,42
Pirimifos-metilo	5,33	8,28	19,84	24,04
Quinalfos	5,52	4,09	15,28	7,46

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

### ***Amostras de Conteúdo Gástrico***

Em amostras de conteúdo gástrico, uma vez que se pretendeu validar como procedimento de ensaio de confirmação qualitativa, foi apenas estudado o limite de deteção a partir da análise do coeficiente de variação das razões entre a Área do Analito e Área do Padrão Interno ( $A_A/A_{PI}$ ), porque devido à heterogeneidade entre amostras e ao

propósito do ensaio não foram preparadas curvas de calibração. Foram utilizadas as áreas das amostras estudadas na Seletividade, fortificadas a  $10^4$  ng/mL, nível de concentração definido com base na experiência adquirida no STF-N e na literatura (Tabela 2), e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 17. Na determinação do CV não foi considerada a área do resultado falso negativo, assim como a de clorfenvinfos de uma amostra após pesquisa da existência de valores anómalos com o teste de Grubbs.

Os valores dos coeficientes de variação foram considerados adequados ao propósito do ensaio, apesar de os CV das amostras de conteúdo gástrico serem superiores a 30% para três inseticidas. É possível afirmar que este comportamento reflete a referida heterogeneidade dos conteúdos.

#### **4.4.4 Arrastamento**

##### ***Amostras de Sangue***

A análise de amostras brancas não fortificadas, intercaladas com amostras positivas no limite superior da gama de trabalho (5000 ng/mL), não mostrou indícios de fenômenos de arrastamento, em ambos os procedimentos, GC-ECD e GC-MS-SIM.

##### ***Amostras de Conteúdo Gástrico***

Na análise das amostras de conteúdo gástrico, os cromatogramas de amostras brancas não fortificadas apresentaram fenômenos de arrastamento após a injeção de amostras fortificadas a  $10^5$  ng/mL. No entanto, a realização de uma nova injeção de uma amostra sem IOFs permitiu observar a eliminação do arrastamento. O fenômeno de arrastamento não se observou após a injeção de amostras fortificadas de concentração  $4 \times 10^4$  ng/mL. Assim, como medida preventiva e dado que na rotina do laboratório podem surgir casos de amostras de conteúdo gástrico com concentrações de inseticidas muito elevadas é recomendável a realização de uma injeção de, por exemplo, isooctano (o solvente utilizado) entre análise de amostras.

#### 4.4.5 Eficiência de Extração

##### *Amostras de Sangue*

A eficiência de extração ( $\eta$ ) foi calculada através de uma comparação direta entre a razão  $A_A/A_{PI}$  obtida a partir de amostras fortificadas antes da extração, e a razão  $A_A/A_{PI}$  de amostras fortificadas com o analito após a extração (o padrão interno foi adicionado antes da extração). As amostras foram fortificadas em dois níveis de concentração. O nível alto nas amostras de sangue correspondeu a 4000 ng/mL, e o nível baixo a 100 ng/mL, com exceção do pirimifos-metilo (600 ng/mL).

Na Tabela 18 são apresentados os resultados do rendimento de extração obtidos na análise por GC-MS-SIM, uma vez que este sistema analítico permite a identificação de todos os compostos.

**Tabela 18 – Resultados da Eficiência da Extração obtidos**

Inseticidas	$\eta_{\text{Sangue}} (\%)$			$\eta_{\text{Conteúdo Gástrico}} (\%)$		
	600 ng/mL	4000 ng/mL	Rend. médio	15 000 ng/mL	100 000 ng/mL	Rend. médio
Clorfenvinfos	80,93	90,23	85,58	38,12	45,51	41,81
Clorpirifos	79,08	69,26	74,17	64,51	18,49	41,50
Diazinão	86,30	92,95	89,63	84,78	13,76	49,27
Dimetoato	93,28	101,31	97,29	36,08	52,99	44,53
Fentião	71,76	72,89	72,32	69,10	29,85	49,48
Fosalona	88,14	65,38	76,76	34,64	50,15	42,40
Malatião	78,29	85,96	82,12	52,25	41,08	46,67
Paratião	82,47	79,25	80,86	68,96	29,25	49,10
Pirimifos-metilo	114,31	90,24	102,27	73,39	23,85	48,62
Quinalfos	79,58	82,34	80,96	52,50	39,00	45,75

De um modo geral, foram obtidos rendimentos médios em sangue superiores a 80%, com vários compostos a apresentarem mesmo um rendimento muito próximo de 100% para os dois níveis de concentração como é o caso do dimetoato e do pirimifos-metilo. Estes rendimentos (mesmo os mais baixos) são superiores aos referidos em outros trabalhos [33, 66]. Os resultados obtidos foram considerados adequados ao propósito do ensaio, considerando a sensibilidade do método analítico, nomeadamente os Limites de Quantificação e Detecção calculados.

### *Amostras de Conteúdo Gástrico*

Nas amostras de conteúdo gástrico o rendimento da extração foi avaliado a  $15 \times 10^3$  ng/mL (nível de concentração baixa) e a  $10^5$  ng/mL (nível de concentração alta). As eficiências obtidas na extração de IOFs em conteúdo gástrico (Tabela 18) foram mais baixas em comparação com as de sangue. De um modo geral, o rendimento no nível de concentração baixa foi superior ao do nível de concentração alta. Os rendimentos médios situaram-se todos entre 40 e 50%, mas apresentaram grandes discrepâncias, variando de 13,76 a 84,78 %. Apesar deste comportamento, os resultados foram considerados adequados ao propósito uma vez que se trata um meio muito complexo e heterogéneo, e dada a possibilidade de o procedimento ser aplicado a amostras com concentrações elevadas de inseticidas.

#### **4.4.6 Exatidão**

##### *Amostras de Sangue*

O estudo da exatidão teve início com a determinação da precisão, que consistiu na análise de variâncias (ANOVA, do inglês Analysis of Variances) dos resultados obtidos na análise de três réplicas, ou alíquotas, em oito corridas realizadas em dias diferentes. Os resultados das três réplicas de um dia foram considerados um grupo, num total de oito grupos. A partir dos quadrados médios residuais dos resultados dentro de grupos,  $MS_r$ , e os quadrados médios dos resultados entre grupos (ou quadrados médios *between-run*),  $MS_{run}$ , obtidos na análise de variâncias dos resultados foram estimados o desvio-padrão da repetibilidade,  $s_r$ , o desvio-padrão entre corridas,  $s_{run}$ , e o desvio-padrão da precisão intermédia,  $s_I$  [138, 160]. As réplicas consistiram em amostras brancas fortificadas a dois níveis de concentração, um representativo da gama de concentração baixa (no primeiro quartil da gama de trabalho) e outro da gama de concentração alta (no quarto quartil), 600 e 4000 ng/mL, respetivamente. Posteriormente, em condições de precisão intermédia (com a exceção do operador, que foi sempre o mesmo), o procedimento de ensaio foi executado. Em cada um dos níveis foi satisfeita a condição de  $t(n - 1) \geq 15$  [138], em que  $n$  é o número de réplicas por dia, e  $t$  o número de dias. Os resultados, apresentados na sua totalidade no **Anexo D**, foram analisados com a ferramenta ANOVA: *fator único* do

programa informático *Excel*<sup>®</sup>. As formas de cálculo destes parâmetros estão indicadas na Tabela 19 [138, 160].

**Tabela 19 – Cálculo das estimativas da precisão dos resultados**

Precisão	Expressões matemáticas
Repetibilidade, $s_r$	$s_r = \sqrt{MS_r}$ (equação 9)
Precisão entre grupos, $s_{run}$	$s_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$ (equação 10)
Precisão intermédia, $s_I$	$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_{run}^2}$ (equação 11)
Limite de repetibilidade, $r$	$r = s_r \times f(n)$ (equação 12)

A estimativa do desvio-padrão da repetibilidade,  $s_r$ , pode ser usada para o cálculo do respetivo limite, que servirá posteriormente de critério de aceitação de um resultado obtido através da realização do procedimento de ensaio. O limite de repetibilidade representa o critério de aceitação para a diferença entre dois resultados obtidos em condições de repetibilidade. Conforme apresentado na equação 12 (Tabela 19), a determinação do limite de repetibilidade resulta da multiplicação de  $s_r$  por um fator de gama crítico,  $f(n)$ , dependente do número de medições, como apresentado na parte 6 do Guia ISO [149] e no procedimento técnico de validação do STF-N (2,8 ou 3,3 para  $n = 2$  ou  $n = 3$ , respetivamente) [138].

Os resultados dos diferentes parâmetros para os dois níveis de concentração com as alíquotas são apresentados nas duas tabelas que se seguem.

**Tabela 20 – Estudo da precisão dos resultados por GC-MS-SIM com três alíquotas de sangue**

Inseticidas	600 ng/mL				4000 ng/mL			
	$s_r$ (ng/mL)	$s_{run}$ (ng/mL)	$s_I$ (ng/mL)	$r$ (%)	$s_r$ (ng/mL)	$s_{run}$ (ng/mL)	$s_I$ (ng/mL)	$r$ (%)
Clorfenvinfos	36,65	89,19	96,43	20,83	278,26	321,22	424,99	21,76
Clorpirifos	33,69	72,77	80,19	20,66	248,06	170,60	301,07	21,08
Diazinão	40,95	101,69	109,63	24,92	237,04	269,77	359,12	20,21
Dimetoato	33,27	71,75	79,09	20,20	268,02	468,99	540,17	19,79
Fentião	46,92	95,35	106,27	29,69	208,92	364,19	419,85	17,36
Fosalona	24,02	94,20	97,21	14,67	201,38	450,68	493,63	16,01
Malatião	27,27	75,85	80,60	16,74	192,05	306,16	361,41	14,97
Paratião	21,77	65,18	68,72	13,18	186,32	321,11	371,25	14,99
Pirimifos-metilo	80,68	67,37	105,11	50,21	236,91	377,05	445,30	19,84
Quinalfos	21,27	69,16	72,36	12,56	200,63	370,74	421,55	16,24

Tabela 21 – Estudo da precisão dos resultados por GC-ECD com três alíquotas de sangue

Inseticidas	600 ng/mL				4000 ng/mL			
	$S_r$ (ng/mL)	$S_{run}$ (ng/mL)	$S_I$ (ng/mL)	$r$ (%)	$S_r$ (ng/mL)	$S_{run}$ (ng/mL)	$S_I$ (ng/mL)	$r$ (%)
Clorfenvinfos	27,24	69,37	74,52	17,12	309,46	299,14	430,40	24,83
Clorpirifos	40,89	98,14	106,32	25,90	270,72	372,95	460,85	22,67
Diazinão	38,50	95,13	102,63	24,51	272,86	345,70	440,41	23,10
Dimetoato	67,23	46,24	81,60	39,11	369,20	411,22	552,64	28,03
Fosalona	23,33	70,16	73,94	13,60	208,88	427,41	475,72	16,57
Malatão	29,84	63,50	70,16	17,97	361,56	341,11	497,07	28,61
Paratão	30,43	85,85	91,08	18,75	172,88	390,76	427,30	14,54
Pirimifos-metilo	50,64	52,99	73,30	29,77	214,03	397,29	451,27	18,36
Quinalfos	23,00	91,67	94,51	14,51	133,69	380,36	403,17	11,36

Contudo, para uma aplicação do procedimento na rotina do laboratório, na procura de uma otimização de custos e menor consumo de volume de amostra, foi proposta a avaliação dos resultados obtidos através de apenas duas alíquotas por amostra. Posto isto, este estudo foi repetido com as duas primeiras alíquotas apresentadas e os resultados apresentados nas tabelas Tabela 22 e Tabela 23.

Tabela 22 – Estudo da precisão dos resultados por GC-MS-SIM com duas alíquotas de sangue

Inseticidas	600 ng/mL				4000 ng/mL			
	$S_r$ (ng/mL)	$S_{run}$ (ng/mL)	$S_I$ (ng/mL)	$r$ (%)	$S_r$ (ng/mL)	$S_{run}$ (ng/mL)	$S_I$ (ng/mL)	$r$ (%)
Clorfenvinfos	36,45	81,73	89,48	17,88	322,15	301,47	441,21	21,57
Clorpirifos	35,16	75,74	83,50	18,31	252,72	98,36	271,19	18,23
Diazinão	52,80	100,37	113,41	27,03	179,33	243,43	302,36	12,71
Dimetoato	43,57	68,90	81,52	22,32	258,19	496,44	559,56	16,31
Fentão	56,71	94,75	110,42	30,73	162,50	308,98	349,11	11,41
Fosalona	24,90	92,20	95,50	13,03	247,75	393,17	464,72	16,84
Malatão	33,88	74,06	81,44	17,63	184,24	311,05	361,52	12,33
Paratão	28,46	63,46	69,55	14,64	184,97	326,39	375,16	12,58
Pirimifos-metilo	62,37	83,91	104,55	31,78	195,47	366,88	415,70	13,72
Quinalfos	25,75	68,12	72,83	12,95	246,52	315,25	400,19	16,90

Tabela 23 – Estudo da precisão dos resultados por GC-ECD com duas alíquotas de sangue

Inseticidas	600 ng/mL				4000 ng/mL			
	$S_r$ (ng/mL)	$S_{run}$ (ng/mL)	$S_I$ (ng/mL)	$r$ (%)	$S_r$ (ng/mL)	$S_{run}$ (ng/mL)	$S_I$ (ng/mL)	$r$ (%)
Clorfenvinfos	34,77	64,24	73,05	18,59	344,05	263,85	433,57	23,70
Clorpirifos	54,23	91,87	106,68	29,28	254,17	415,32	486,93	18,01
Diazinão	46,58	87,51	99,14	25,25	319,36	342,74	468,47	22,93
Dimetoato	78,77	37,94	87,43	38,43	396,66	422,43	579,47	25,61
Fosalona	28,80	64,60	70,73	14,29	167,09	426,56	458,12	11,39
Malatião	36,12	57,81	68,16	18,39	363,68	300,55	471,80	24,83
Paratião	36,89	78,77	86,98	19,35	191,11	399,24	442,62	13,69
Pirimifos-metilo	51,60	56,08	76,21	25,56	217,81	421,39	474,35	15,79
Quinalfos	25,97	85,16	89,03	13,96	137,66	379,12	403,34	9,98

Para efeitos de validação e possível aplicação no trabalho de rotina assumem-se os valores mais elevados do limite de repetibilidade em cada método.

Tabela 24 – Limites de repetibilidade dos resultados de cada composto com três e com duas alíquotas de sangue

Inseticidas	$r_{(3 \text{ alíquotas})}$ (%)		$r_{(2 \text{ alíquotas})}$ (%)	
	GC-MS	GC-ECD	GC-MS	GC-ECD
Clorfenvinfos	21,76	24,83	21,57	23,70
Clorpirifos	21,08	25,90	18,31	29,28
Diazinão	24,92	24,51	27,03	25,25
Dimetoato	20,20	39,11	22,32	38,43
Fentião	29,69	n/a	30,73	n/a
Fosalona	16,01	16,57	16,84	14,29
Malatião	16,74	28,61	17,63	24,83
Paratião	14,99	18,75	14,64	19,35
Pirimifos-metilo	50,21	29,77	31,78	25,56
Quinalfos	16,24	14,51	16,90	13,96

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

A fim de se avaliar se os limites de repetibilidade são estatisticamente diferentes foi realizado um teste *t-student*, com um grau de confiança de 95%, comparando os coeficientes de variação obtidos em cada nível, para cada composto e para cada método, e considerando os grupos de resultados como duas amostras independentes. Os resultados são apresentados na Tabela 25.

**Tabela 25 – Teste *t-student* aos coeficientes de variação em cada nível dos grupos de resultados**

Inseticidas	$t_{(GC-MS)}$		$t_{(GC-ECD)}$	
	600 ng/mL	4000 ng/mL	600 ng/mL	4000 ng/mL
Clorfenvinfos	0,78	0,96	0,47	0,71
Clorpirifos	0,82	0,87	0,67	0,73
Diazinão	0,33	0,21	0,80	0,76
Dimetoato	0,60	0,97	0,87	0,75
Fentião	0,81	0,27	n/a	n/a
Fosalona	0,96	0,92	0,71	0,64
Malatião	0,65	0,78	0,66	0,68
Paratião	0,50	0,85	0,67	0,57
Pirimifos-metilo	0,74	0,19	0,98	0,66
Quinalfos	0,68	0,59	0,88	0,83

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

Uma vez que todos os valores do teste *t-student* ( $t_{exp}$ ) foram inferiores ao valor crítico ( $t_{crit}$ ) extraído da tabela bilateral do teste *t-student* (2,14 para 14 graus de liberdade e  $\alpha=0,05$  [157]), conclui-se que os valores dos limites de repetibilidade obtidos quer para duas, quer para três alíquotas, não são significativamente diferentes e, por isso, é possível aplicar o método na rotina do laboratório usando apenas duas alíquotas de sangue. Pelo mesmo motivo a estimativa da incerteza de medição foi realizada considerando apenas duas alíquotas. Isto implica que, na prática, aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se a diferença entre ambas for igual ou inferior ao limite de repetibilidade [144], que varia entre 13,96% e 38,43 % em GC-ECD, e entre 14,64% e 31,78% em GC-MS-SIM (Tabela 24)

Dado que os ensaios interlaboratoriais estão fora do âmbito dos procedimentos de ensaio para os IOFs, este estudo não contempla a determinação da reprodutibilidade.

Neste trabalho, a estimativa da incerteza de medição foi realizada com base na abordagem de dados da validação recolhidos em ambiente intralaboratorial. A aplicação desta abordagem consiste na combinação das incertezas associadas à precisão e à veracidade do método, com fontes de incerteza relevantes que são mantidas constantes na sequência da realização de ensaios experimentais necessários à quantificação da precisão e de veracidade.



A quantificação da *incerteza associada à precisão* é normalmente avaliada em condições de precisão intermédia de modo a refletir eventuais variações do desempenho do método em função de alterações de parâmetros experimentais que habitualmente são mantidos constantes no mesmo dia de trabalho.

Neste caso, a incerteza padrão associada à precisão é combinada com as outras fontes de incerteza, e assume-se que [150, 161]:

$$u_{\text{precisão}} = s_{\text{precisão}} \quad (\text{equação 13})$$

onde:

$u_{\text{precisão}}$  – incerteza padrão associada à precisão;

$s_{\text{precisão}}$  – desvio-padrão de resultados réplicas de uma amostra ou padrão de controlo, obtidos em condições de precisão intermédia.

e cuja determinação do desvio-padrão a partir de réplicas de diversas amostras ou padrões, com  $n$  réplicas em  $t$  dias, é realizada de acordo com a seguinte equação [150, 161]:

$$s_{\text{precisão}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}{t(n-1)}} \quad (\text{equação 14})$$

em que:

$y_{jk}$  – resultado da réplica  $k$  ( $k$  varia de 1 a  $n$ ) do dia  $j$  ( $j$  varia de 1 a  $t$ );

$\bar{y}_j$  – média aritmética dos resultados de  $n$  ensaios realizados no dia  $j$ .

A avaliação do comportamento do método a dois níveis de concentração tornou necessário estimar a incerteza padrão relativa associada à precisão,  $u'_{\text{precisão}}$ , a partir da equação que se segue [150, 161]:

$$u'_{\text{precisão}} = s_{\text{precisão}}/y \quad (\text{equação 15})$$

Aplicando estas equações aos dados experimentais com duas alíquotas obteve-se então as incertezas relativas associadas à precisão, as quais são mostradas na Tabela 26. Foram consideradas apenas duas alíquotas porque foi mostrado anteriormente que os limites de repetibilidade não eram estatisticamente diferentes.

Tabela 26 – Incertezas-padrão relativas associadas à precisão dos resultados

Inseticidas	$u'_{\text{precisão}}$ (GC-MS) (%)		$u'_{\text{precisão}}$ (GC-ECD) (%)	
	600 ng/mL	4000 ng/mL	600 ng/mL	4000 ng/mL
Clorfenvinfos	6,39	7,70	6,64	8,46
Clorpirifos	6,54	6,51	10,46	6,43
Diazinão	9,65	4,54	9,02	8,19
Dimetoato	7,97	5,83	13,72	9,15
Fentião	10,98	4,08	n/a	n/a
Fosalona	4,65	6,01	5,10	4,07
Malatião	6,30	4,40	6,57	8,87
Paratião	5,23	4,49	6,91	4,89
Pirimifos-metilo	11,35	4,90	9,13	5,64
Quinalfos	4,63	6,04	4,98	3,56

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

A estimativa da *incerteza associada à veracidade* pode ser realizada com base em materiais de referência certificados (MRC), amostras fortificadas ou amostras analisadas por um método de referência. Dada a inexistência de MRC e de um método de referência, a primeira e a terceira opções não são possíveis, pelo que a veracidade do método foi então avaliada com base no cálculo da *recuperação média*,  $\bar{R}_m$ , do método resultante da análise de amostras sem analito nativo posteriormente fortificadas, conforme expresso na equação 21 [150, 161]:

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{fortificada}} \quad (\text{equação 16})$$

onde:

$\bar{C}_{obs}$  – concentração média de uma série de análises de amostras fortificadas;

$C_{fortificada}$  – concentração da amostra fortificada.

Assim, a recuperação média pode ser entendida como uma estimativa do erro da veracidade. Na Tabela 27 são apresentados os resultados relativos a este parâmetro, onde é possível verificar que a recuperação média para todos os inseticidas foi superior a 85%, e que os valores mais baixos foram obtidos nas amostras fortificadas a concentrações de 600 ng/mL.

Tabela 27 – Recuperações obtidas na análise das amostras de sangue

Inseticidas	$\bar{R}_m$ (GC-MS) (%)		$\bar{R}_m$ (GC-ECD) (%)	
	600 ng/mL	4000 ng/mL	600 ng/mL	4000 ng/mL
Clorfenvinfos	95,11	104,56	87,26	101,62
Clorpirifos	89,62	97,05	86,43	98,78
Diazinão	91,16	98,80	86,10	97,49
Dimetoato	91,07	110,80	95,65	108,41
Fentião	86,11	99,66	n/a	n/a
Fosalona	89,17	102,99	94,05	102,68
Malatião	89,64	104,58	91,67	102,51
Paratião	90,73	102,94	88,96	97,68
Pirimifos-metilo	91,58	99,73	94,21	96,56
Quinalfos	92,78	102,10	86,83	96,56

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

Neste caso, a *incerteza-padrão*,  $u(\bar{R}_m)$ , associada à  $\bar{R}_m$ , é função da incerteza associada à fortificação da amostra como apresentado abaixo [150, 161]:

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{fortificada})}{C_{fortificada}}\right)^2} \quad (\text{equação 17})$$

onde:

$s_{obs}$  – desvio-padrão de uma série de análises de amostras fortificadas;

$n$  – número de amostras fortificadas;

$u(C_{fortificada})$  – incerteza-padrão associada ao teor das amostras fortificadas (isto é, associada à fortificação da amostra).

Considera-se desprezável o último termo da equação 17 [ $u(C_{fortificada})/C_{fortificada}$ ] a partir de uma seleção cuidada dos padrões e das operações gravimétricas e/ou volumétricas envolvidas na fortificação da amostra.

Dado que a exatidão foi estudada a dois níveis de concentração, o termo  $s_{obs}^2/n \times \bar{C}_{obs}^2$  pode ser substituído pela variância associada às recuperações individuais estimadas a dividir pelo número de ensaios realizados ( $s_R^2/n$ ) de forma equivalente ao descrito na alínea anterior.

Assim, a equação da incerteza-padrão associada à veracidade pode ser reduzida a [150, 161]:

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_R^2}{n}} \quad (\text{equação 18})$$

e com qual se determinou os resultados obtidos na Tabela abaixo.

**Tabela 28 – Incertezas-padrão associadas à veracidade dos resultados**

<b>Inseticidas</b>	<b><math>u(\bar{R}_m)_{(GC-MS)}</math> (%)</b>		<b><math>u(\bar{R}_m)_{(GC-ECD)}</math> (%)</b>	
	<b>600 ng/mL</b>	<b>4000 ng/mL</b>	<b>600 ng/mL</b>	<b>4000 ng/mL</b>
Clorfenvinfos	3,45	2,84	2,59	2,72
Clorpirifos	3,03	1,64	3,75	2,93
Diazinão	4,19	1,83	3,46	2,80
Dimetoato	3,02	3,77	3,46	3,86
Fentião	3,86	2,12	n/a	n/a
Fosalona	3,44	2,92	2,69	2,85
Malatão	2,96	2,30	2,54	2,98
Paratão	2,56	2,35	3,13	2,63
Pirimifos-metilo	3,90	2,52	2,94	2,79
Quinalfos	2,73	2,50	3,12	2,36

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

Uma vez estimada a incerteza-padrão associada à veracidade tornou-se necessário avaliar se os resultados são afetados por desvios sistemáticos relevantes que necessitem de correção. Este estudo é realizado através de um teste *t-student*, ou através de outras ferramentas consideradas válidas (ex: análise de tendências – visual ou outra) [150]. O teste *t-student* consistiu na avaliação se a recuperação do método é significativamente diferente de 1, em que o valor de  $t_{obs}$  foi determinado como apresentado na equação abaixo:

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{R}_m|}{u(\bar{R}_m)} \quad (\text{equação 19})$$

com os resultados da avaliação da veracidade do método em cada nível e em cada detetor.

O resultado do teste *t-student* ( $t_{exp}$ ) foi então comparado com um valor crítico ( $t_{crít} = 2,07$ ) extraído de uma tabela *t-student* bilateral, com  $t \times n - 1 = 15$  graus de liberdade, e um nível de confiança igual a 95%. Nos casos em que  $t_{obs} < t_{crít}$  considerou-se que a recuperação do método,  $\bar{R}_m$ , não foi significativamente diferente de 1 (isto é, 100%), como se observou para a maioria dos pesticidas no nível alto em ambos procedimentos de ensaio.

**Tabela 29 – Teste *t-student* para a incerteza-padrão associada à veracidade dos resultados**

Inseticidas	$t_{(GC-MS)}$		$t_{(GC-ECD)}$	
	600 ng/mL	4000 ng/mL	600 ng/mL	4000 ng/mL
Clorfenvinfos	1,42	1,61	4,93	0,60
Clorpirifos	3,42	1,80	3,62	0,42
Diazinão	2,11	0,66	4,01	0,89
Dimetoato	2,96	2,86	1,26	2,18
Fentião	3,60	0,16	n/a	n/a
Fosalona	3,15	1,02	2,21	0,94
Malatião	3,50	1,99	3,28	0,84
Paratião	3,63	1,25	3,52	0,88
Pirimifos-metilo	2,16	0,11	1,97	1,24
Quinalfos	2,64	0,84	4,22	1,46

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

Nesta situação, a *incerteza-padrão relativa*,  $u'(\bar{R}_m)$ , necessária à quantificação da incerteza combinada (abordada mais à frente) foi considerada equivalente à incerteza padrão. Em sentido inverso, nos casos em que  $t_{exp} > t_{crit}$ , essencialmente e na maioria dos inseticidas a concentração de 600 ng/mL também em ambos os métodos, a recuperação do método foi considerada diferente de 1 e procedeu-se então à correção da veracidade dos resultados dos ensaios com a determinação da incerteza-padrão relativa a partir da equação 20 [150] e cujos resultados são apresentados na Tabela 30:

$$u'(\bar{R}_m) = u(\bar{R}_m)/\bar{R}_m \quad (\text{equação 20})$$

**Tabela 30 – Incertezas-padrão relativas associadas à veracidade dos resultados**

Inseticidas	$u'(\bar{R}_m)_{(GC-MS)} (\%)$		$u'(\bar{R}_m)_{(GC-ECD)} (\%)$	
	600 ng/mL	4000 ng/mL	600 ng/mL	4000 ng/mL
Clorfenvinfos	3,45	2,84	2,96	2,72
Clorpirifos	3,38	1,64	4,33	2,93
Diazinão	4,19	1,83	4,02	2,80
Dimetoato	3,31	3,40	3,46	3,56
Fentião	4,49	2,12	n/a	n/a
Fosalona	3,85	2,92	2,86	2,85
Malatião	3,30	2,30	2,77	2,98
Paratião	2,82	2,35	3,52	2,63
Pirimifos-metilo	4,26	2,52	2,94	2,79
Quinalfos	2,94	2,50	3,59	2,36

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

Por fim, com a incerteza-padrão relativa determinada foram combinadas as diferentes fontes de incerteza, obtendo-se deste modo a *incerteza-padrão combinada*,  $u(y)$  [150, 161]:

$$u(y) = y \times \sqrt{(u'_{\text{precisão}})^2 + (u'(\bar{R}_m))^2} \quad (\text{equação 21})$$

Uma vez que as várias componentes da incerteza foram estimadas recorrendo a um número elevado de ensaios experimentais é estimada a *incerteza expandida combinada*,  $U(y)$ , para um nível de confiança igual a 95%, a partir da multiplicação por um fator de expansão,  $k$ , normalmente igual a 2 [150, 161]:

$$U(y) = u(y) \times k \quad (\text{equação 22})$$

Os resultados destes dois parâmetros da incerteza são apresentados na Tabela 31 e expressos em percentagem para permitir a comparação entre os dados nos dois níveis estudados.

**Tabela 31 – Incertezas-padrão combinadas e incertezas expandidas combinadas dos resultados**

Inseticidas	GC-MS				GC-ECD			
	$u(y)$ (%)		$U(y)$ (%)		$u(y)$ (%)		$U(y)$ (%)	
	600 ng/mL	4000 ng/mL	600 ng/mL	4000 ng/mL	600 ng/mL	4000 ng/mL	600 ng/mL	4000 ng/mL
Clorfenvinfos	7,26	8,21	14,51	16,42	7,27	8,89	14,54	17,78
Clorpirifos	7,36	6,71	14,72	13,43	11,32	7,07	22,64	14,14
Diazinão	10,52	4,89	21,05	9,78	9,87	8,66	19,75	17,31
Dimetoato	8,63	6,75	17,27	13,50	14,15	9,81	28,31	19,63
Fentião	11,86	4,59	23,71	9,19	n/a	n/a	n/a	n/a
Fosalona	6,04	6,69	12,08	13,37	5,85	4,97	11,70	9,94
Malatião	7,11	4,97	14,22	9,94	7,13	9,36	14,25	18,71
Paratião	5,94	5,07	11,88	10,14	7,76	5,55	15,52	11,10
Pirimifos-metilo	12,12	5,51	24,25	11,02	9,59	6,29	19,18	12,58
Quinalfos	5,48	6,53	10,97	13,07	6,14	4,28	12,29	8,55

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

Por fim, a incerteza expandida combinada foi majorada a partir da escolha dos valores mais elevados para cada composto e em cada método, abrangendo toda a gama de trabalho. Assume-se, então, para efeitos de validação e trabalho de rotina, o método como exato com as referidas incertezas apresentadas na tabela seguinte (com  $k = 2$ ).

**Tabela 32 – Incertezas-padrão expandidas combinadas associadas aos métodos**

<b>Inseticidas</b>	<b><math>U(y)_{(GC-MS)}</math> (%)</b>	<b><math>U(y)_{(GC-ECD)}</math> (%)</b>
Clorfenvinfos	16,42	17,78
Clorpirifos	14,74	22,64
Diazinão	21,05	19,75
Dimetoato	17,27	28,31
Fentião	23,71	n/a
Fosalona	13,37	11,70
Malatão	14,22	18,71
Paratão	11,88	15,52
Pirimifos-metilo	24,25	19,18
Quinalfos	13,07	12,29

n/a – não aplicável, porque o detetor não é sensível na gama em estudo

A maioria dos valores mais elevados de incertezas-padrão correspondeu a amostras no nível baixo de concentração, chegando a atingir valores tão altos quanto 28,31% em GC-ECD ou 24,25% em GC-MS-SIM.

#### 4.4.7 Robustez

Ao longo de todo o processo de validação fizeram-se variar parâmetros, quer de forma propositada, quer no âmbito do normal funcionamento dos equipamentos, não se observando diferenças nos resultados analíticos. Os parâmetros variados incluem a utilização de diferentes soluções de trabalho, quer de analitos, quer de padrão interno, utilização de pipetas diferentes, centrífugas e extratores manuais diferentes, e evaporação dos eluatos em evaporador rotativo com vácuo e evaporador de corrente de  $N_2$  com temperatura definida por banho, sujeita aos desvios inerentes ao próprio equipamento.





## 5 Conclusões

Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias para rastreio, confirmação qualitativa e quantificação de inseticidas organofosforados em amostras de sangue total, bem como para rastreio e confirmação qualitativa em amostras de conteúdo gástrico. Este trabalho surgiu aliado à necessidade de os procedimentos usados na rotina laboratorial serem validados tendo por base a *NP EN ISO/IEC 17025:2005*, e estando a sua aplicação associada a um novo equipamento.

Apesar de várias vezes descrita a utilização de GC-MS-SIM, não foi encontrada na literatura qualquer referência a trabalhos com GC-ECD em amostras biológicas humanas e, por isso, esta será a primeira descrição da utilização de um detetor de captura eletrónica acoplado a um cromatógrafo gasoso na análise deste tipo de amostras.

Os procedimentos desenvolvidos têm ainda como vantagem a não utilização de soluções-tampão e outras soluções de preparação mais morosa e precisa, baseando-se os mesmos procedimentos na utilização de solventes orgânicos e de misturas binárias facilmente disponibilizadas em qualquer laboratório, com uma abrangência de utilização generalista.

Antes da validação do procedimento para amostras de sangue total foram testados dois procedimentos de SPE com colunas Oasis<sup>®</sup> HLB e um com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> C18, adaptados de Park *et al.* [40], Raposo *et al.* [33] e Liu *et al.* [84], respetivamente. Dado que os sinais mais intensos foram obtidos com as amostras fortificadas preparadas com o procedimento com as colunas Sep-Pak<sup>®</sup> e se registaram interferências nos cromatogramas dos iões selecionados para a fosfona com os procedimentos com colunas HLB, o procedimento de extração com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> foi selecionado para validação. O procedimento escolhido foi testado com diferentes volumes de cada um dos solventes utilizados no condicionamento das colunas (10, 5 e 2 mL), não se provando que qualquer um deles fosse melhor em relação aos restantes. Por isso, adotou-se a metodologia que utiliza 2 mL de cada solvente.

Durante a validação foram identificados todos os IOFs em amostras de sangue, com exceção do fentão por GC-ECD. O analito não foi detetado em amostras de sangue dentro da gama de trabalho definida para os restantes inseticidas. O detetor de captura eletrónica

também mostrou ser pouco sensível ao pirimifos-metilo, o que se refletiu na utilização de uma gama de trabalho mais estreita para análise de amostras de sangue por GC-ECD. Os limites de detecção e de quantificação obtidos são adequados ao propósito, dado que foram inferiores a todos os valores de intoxicações fatais encontrados.

Os modelos que melhor traduziram a variação do sinal analítico em função da concentração de analito em amostras de sangue consistiram em modelos de regressão linear ponderada, sendo o fator de ponderação  $1/x^2$  aquele que apresentou a menor soma dos erros relativos percentuais para praticamente todos os IOFs, à exceção do pirimifos-metilo por GC-ECD. Neste caso, a menor soma obtida correspondeu ao fator  $1/y^2$ .

Aquando do estudo da exatidão, os coeficientes de variação dos resultados mostraram que o limite de repetibilidade não foi afetado pelo número de alíquotas e, por isso, o método pode ser realizado com apenas duas alíquotas, em vez de três.

No desenvolvimento dos procedimentos de extração em amostras de conteúdo gástrico foi testada a extração em fase sólida que apresentou um elevado risco de as colunas colmatarem, tornando o método inadequado. A extração líquido-líquido testada não se mostrou eficaz na remoção de interferentes, razão pela qual não foi possível diferenciar os picos dos IOFs entre os sinais intensos de interferentes nos cromatogramas de alguns iões em GC-MS-SIM. Assim, foi adotado um procedimento que consistiu em LLE com éter dietílico, evaporação do solvente e retoma em acetonitrilo, seguindo-se SPE com colunas Sep-Pak<sup>®</sup> C18, para posterior separação e detecção por GC-ECD e GC-MS-SIM.

Apesar da não remoção completa de interferentes esta metodologia mostrou ser seletiva e permitiu a confirmação da identidade dos inseticidas em amostras de conteúdo gástrico e de água acidificada (pH 4). A água acidificada com ácido clorídrico serviu como controlo de qualidade interno que, dada a reconhecida heterogeneidade dos conteúdos gástricos, tentou ser representativa desta amostra em termos de pH. Os limites de detecção encontrados mostraram ser suficientes para a identificação dos analitos de acordo com os valores encontrados em intoxicações fatais.

Verificou-se que há a possibilidade de fenómenos de arrastamento após a análise de amostras com concentrações de IOFs muito elevadas (acima de 100 µg/mL), que no entanto pode ser eliminada pela realização de uma injeção de isooctano entre amostras.

Os métodos aqui apresentados foram considerados validados e adequados ao propósito do ensaio, e já foram introduzidos na rotina pericial do STF-N. O método com separação e detecção por GC-MS-SIM é utilizado para rastreio enquanto o método por GC-ECD é utilizado para confirmação qualitativa para os dois tipos de amostras em causa, devido à baixa sensibilidade do ECD para o fentão e o pirimifos-metilo. Deste modo, foi assegurada a detecção dos dois inseticidas. Para quantificação em amostras de sangue foi selecionado o procedimento com separação por GC-MS-SIM.

Uma vez validados, é importante considerar que estes métodos devem, como qualquer outro, ser alvo de constantes melhorias. Neste sentido, propõem-se algumas abordagens que poderão ser tidas em conta em trabalhos futuros neste campo. A primeira será a avaliação da precisão intermédia, o estudo da veracidade e a estimativa da incerteza de medição, na análise de amostras de sangue em análises toxicológicas de rotina, através da análise de amostras fortificadas como controlos de qualidade internos.

No que diz respeito aos procedimentos de extração em amostras de conteúdo gástrico, estes poderão ser otimizados tendo em vista a adoção de um procedimento que remova ainda mais interferentes permitindo assim a obtenção de limites de detecção mais baixos.

Será também importante o estudo da estabilidade dos analitos na fase extrativa e na fase cromatográfica a longo prazo, ou seja, no âmbito do tempo necessário para a execução de uma série de trabalho, assim como nos ciclos de congelação/descongelação que a amostra pode sofrer até se determinar a concentração de um IOF nas amostras de sangue, após os passos de rastreio e confirmação qualitativa precedentes.

Por fim, é ainda sugerido o acompanhamento da legislação que regula a proibição e a introdução de pesticidas no mercado, de modo a ajustar a abrangência dos métodos de análise.



## 6 Referências

1. Korrapati M.C., Mehendale H.M.; Xenobiotics, *in* Encyclopedia of Toxicology; Volume 4; 2ª edição; Wexler P. (Ed.); Elsevier Academic Press: Boston; 2005; 469-470.
2. Krieger W.C.; Foreword, *in* Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology; 3ª edição; Krieger R. (Ed.); Academic Press: Londres; 2010; xxix-xxxvi.
3. Krenzelok E.P.; Toxicology basics of nonmedical agent exposures *in* Poisoning and Toxicology Handbook; 4ª edição; Leikin J.B., Paloucek F.P. (Ed.); Informa Healthcare: Nova Iorque; 2008; 730-734.
4. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., Jickells S., Negrusz A.; Introduction to forensic toxicology, Cap. 1, *in* Clarke's Analytical Forensic Toxicology; Jickells S., Negrusz A. (Ed.); Pharmaceutical Press: Londres; 2008; 1-12.
5. Manahan S.E.; Toxicology, Cap. 6, *in* Toxicological Chemistry and Biochemistry; 3ª edição; Lewis Publishers: Boca Raton; 2003; 115-138.
6. Castro A.; Quantificação de Club Drugs em Amostras Biológicas em Toxicologia Forense; Tese de Mestrado em Métodos Biomoleculares Avançados; Departamento de Química da Universidade de Aveiro; Aveiro; 2008.
7. Leonardo A.J., Martins D.R., Fiolhais C.; António da Costa Simões e a génese da química forense em Portugal; *Rev. Bras. Hist. Ciência*; 2009; 2 (2); 192-205.
8. Tarelho S.; Implementação de técnicas analíticas de determinação de benzodiazepinas aplicadas à Toxicologia Forense; Tese de Mestrado em Métodos Instrumentais e Controlo de Qualidade Analítica; Departamento de Química da Universidade de Aveiro; Aveiro; 2003.
9. Eaton D.L., Klassen C.D.; Principles of Toxicology, Cap. 2, *in* Casarett and Doull's Toxicology - The basic science of poisons; 6ª edição; Klassen C.D. (Ed.); McGraw-Hill: Nova Iorque; 2001; 11-34.
10. Villanueva Cañadas E.; Introducción a la toxicología, Cap. 51, *in* Medicina legal y toxicología; 6ª edição; Gisbert Calabuig J.A. (Ed.); Masson: Barcelona; 2004; 597-604.
11. Chilakapati J., Mehendale H.M.; Acceptable Daily Intake (ADI), *in* Encyclopedia of Toxicology; Volume 1; 2ª edição; Wexler P. (Ed.); Elsevier Academic Press: Boston; 2005; 6-7.
12. Rozman K.K., Klassen C.D.; Absorption, Distribution and Excretion of Toxicants, Cap. 5, *in* Casarett and Doull's Toxicology - The basic science of poisons; 6ª edição; Klassen C.D. (Ed.); McGraw-Hill: Nova Iorque; 2001; 107-132.
13. Drummer O.H.; Pharmacokinetics and metabolism, Cap. 2, *in* Clarke's Analytical Forensic Toxicology; Jickells S., Negrusz A. (Ed.); Pharmaceutical Press: Londres; 2008; 13-42.
14. Parkinson A.; Biotransformation of Xenobiotics, Cap. 6, *in* Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons; 6ª edição; Klassen C.D. (Ed.); McGraw-Hill: Nova Iorque; 2001; 133-224.
15. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides; 2002; Disponível em:

- <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/Code/Download/code.pdf>, [consulta: 26-10-2012].
16. Vasilescu M.N., Medvedovici A.V.; Pesticides, *in* Encyclopedia of Analytical Science; Volume 7; 2ª edição; Worsfold P.J., Townshend A., Poole C. (Ed.); Elsevier Academic Press: San Diego; 2005; 55-72.
  17. Pope C.N.; Pesticides, *in* Encyclopedia of Toxicology; Volume 3; 2ª edição; Wexler P. (Ed.); Elsevier Academic Press: Boston; 2005; 371-372.
  18. Ecobichon D.J.; Toxic Effects of Pesticides, Cap. 22, *in* Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons; 6ª edição; Klassen C.D. (Ed.); McGraw-Hill: Nova Iorque; 2001; 763-810.
  19. United States Environmental Protection Agency (EPA); Pesticides Industry Sales and Usage - 2006 and 2007 Market Estimates; 2011; Disponível em: [http://www.epa.gov/pesticides/pestsales/07pestsales/market\\_estimates2007.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf), [consulta: 16-11-2012].
  20. United States Environmental Protection Agency (EPA); Pesticides Industry Sales and Usage - 2000 and 2001 Market Estimates; 2004; Disponível em: [http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/01pestsales/market\\_estimates2001.pdf](http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/01pestsales/market_estimates2001.pdf), [consulta: 16-11-2012].
  21. United States Environmental Protection Agency (EPA); Pesticides Industry Sales and Usage - 1996 and 1997 Market Estimates; 1999; Disponível em: [http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/97pestsales/market\\_estimates1997.pdf](http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/97pestsales/market_estimates1997.pdf), [consulta: 16-11-2012].
  22. United States Environmental Protection Agency (EPA); Pesticides Industry Sales and Usage - 1994 and 1995 Market Estimates; 1997; Disponível em: [http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/95pestsales/market\\_estimates1995.pdf](http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/95pestsales/market_estimates1995.pdf), [consulta: 16-11-2012].
  23. Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) - Ministério da Agricultura, Ambiente, Mar e Ordenamento do Território; Relatórios de Vendas de Produtos Fitofarmacêuticos em Portugal (de 2001 a 2010); Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=4218634&cboui=4218634>, [consulta: 28-10-2012].
  24. Carson R.; Silent Spring; Fawcett Publications: Greenwich; 1962.
  25. Nakamaru M., Iwasa Y., Nakanishi J.; Extinction risk to bird populations caused by DDT exposure; *Chemosphere*; 2003; **53** (4); 377-387.
  26. Water Pollution, Cap. 7, *in* Environmental Chemistry; 7ª edição; Manahan S.E. (Ed.); Lewis Publishers: Boca Raton; 2000.
  27. World Health Organization (WHO); The Impact of Pesticides on Health: Preventing Intentional and Unintentional Deaths from Pesticide Poisoning; 2004; Disponível em: [http://www.who.int/mental\\_health/prevention/suicide/en/PesticidesHealth2.pdf](http://www.who.int/mental_health/prevention/suicide/en/PesticidesHealth2.pdf), [consulta: 20-10-2012].
  28. Gunnell D., Eddleston M., Phillips M.R., Konradsen F.; The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review; *BMC Public Health*; 2007; **7**.
  29. Silva P.; Perfil epidemiológico de internamentos por intoxicação aguda nos HUC: 2000-2007; Tese de Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia; Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro; Aveiro; 2009.

30. World Health Organization (WHO); The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification; 2009; Disponível em: [http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class\\_2009.pdf](http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class_2009.pdf), [consulta: 12-11-2012].
31. Peter J.V., Jerobin J., Nair A., Bennett A.; Is there a relationship between the WHO hazard classification of organophosphate pesticide and outcomes in suicidal human poisoning with commercial organophosphate formulations?; *Regul. Toxicol. Pharmacol.*; 2010; **57** (1); 99-102.
32. Teixeira H., Proenca P., Alvarenga M., Oliveira M., Marques E.P., Vieira D.N.; Pesticide intoxications in the Centre of Portugal: three years analysis; *Forensic Sci. Int.*; 2004; **143** (2-3); 199-204.
33. Raposo R., Barroso M., Fonseca S., Costa S., Queiroz J.A., Gallardo E., Dias M.; Determination of eight selected organophosphorus insecticides in postmortem blood samples using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; 2010; **24** (21); 3187-3194.
34. Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) - Ministério da Agricultura, Ambiente, Mar e Ordenamento do Território; Lista de produtos com Venda Autorizada; [Em linha]; Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=3666233&cboui=3666233>; [consulta: 28-10-2012].
35. Chlorfenvinphos, in *The Pesticide Manual: a world compendium*; 12ª edição; Tomlin C.D.S. (Ed.); British Crop Protection Council: Surrey; 2000.
36. Insecticides; Hutson D.H., Roberts T.R. (Ed.); John Wiley & Sons: Chichester; 1985.
37. Metcalf R.L., Muller F.; Insecticides, Cap. 8, in *Agrochemicals: Composition, Production, Toxicology, Applications*; Muller F. (Ed.); Wiley-VCH: Weinheim; 2000; 530-551.
38. Synthetic Insecticides II: Organophosphorus and Carbamate Compounds, Cap. 6, in *Agrochemicals: Preparation and Mode of Action*; Cremlyn R.J. (Ed.); John Wiley & Sons: Chichester; 1991; 105-156.
39. PPDB: Pesticide Properties DataBase; [Em linha]; Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/projects/ppdb/index.htm>; [consulta: 18-11-2012].
40. Park M.-J., In S.-W., Lee S.-K., Choi W.-K., Park Y.-S., Chung H.-S.; Postmortem blood concentrations of organophosphorus pesticides; *Forensic Sci. Int.*; 2009; **184** (1-3); 28-31.
41. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons; 3ª edição; Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. (Ed.); Volume II; Pharmaceutical Press: Londres; 2004.
42. Baselt R.C.; Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man; 6ª edição; Biomedical Publications: Foster City; 2002.
43. Tarbah F.A., Shaheen A.M., Benomran F.A., Hassan A.I., Daldrup T.; Distribution of dimethoate in the body after a fatal organophosphate intoxication; *Forensic Sci. Int.*; 2007; **170** (2-3); 129-132.
44. Thompson T.S., Treble R.G., Magliocco A., Roettger J.R., Eichhorst J.C.; Case study: fatal poisoning by malathion; *Forensic Sci. Int.*; 1998; **95** (2); 89-98.
45. Wollersen H., Mussoff F.; Chromatographic Techniques for Measuring Organophosphorus Pesticides, Cap. 9, in *Chromatographic Methods in Clinical Chemistry and Toxicology*; Bertholf R., Winecker R. (Ed.); John Wiley & Sons: Chichester; 2007; 139-169.

46. Quinn D.M.; Acetylcholinesterase - enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition-states; *Chem. Rev.*; 1987; **87** (5); 955-979.
47. Taylor P., Radic Z.; The cholinesterases - from genes to proteins; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 1994; **34**; 281-320.
48. Hurst C.G., Newmark J., Romano J.A.; Chemical Bioterrorism, Cap. 206, in Harrison's Principles of Internal Medicine; 16ª edição; Kasper D.L., Braunwald E., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L., Fauci A.S. (Ed.); McGraw-Hill: Nova Iorque; 2004; 1288-1294.
49. Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR); Toxicological profile of Chlorfenvinphos; 1997; Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp83.pdf>, [consulta: 07-12-2011].
50. Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR); Toxicological profile of Chlorpirifos; 1997; Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.pdf>, [consulta: 07-12-2011].
51. Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR); Toxicological profile of Diazinon; 2008; Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp86.pdf>, [consulta: 07-12-2011].
52. Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR); Toxicological profile of Malathion; 2003; Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp154.pdf>, [consulta: 07-12-2011].
53. Organophosphorus insecticides, in Metabolic Pathways of Agrochemicals, part II - Insecticides and Fungicides; Roberts T., Hutson D. (Ed.); Royal Society of Chemistry: Cambridge; 1999; 187-522.
54. World Health Organization (WHO); Dimethoate; in Environmental Health Criteria (90); 1989; Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc90.htm>, [consulta: 01-12-2011].
55. Dulaurent S., Saint-Marcoux F., Marquet P., Lachatre G.; Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. B*; 2006; **831** (1-2); 223-229.
56. Kavvalakis M.P., Tsatsakis A.M.; The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure; *Forensic Sci. Int.*; 2012; **218** (1-3); 111-122.
57. Namba T.; Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects; *Bull. World Health Organ.*; 1971; **44** (1-3); 289-307.
58. Vasilic Z., Drevenkar V., Rumenjak V., Stengl B., Frobe Z.; Urinary-excretion of diethylphosphorus metabolites in persons poisoned by quinalphos or chlorpyrifos; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 1992; **22** (4); 351-357.
59. World Health Organization (WHO); Principles for the toxicological assessment of pesticides residues in food; in Environmental Health Criteria (104); 1990; Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc104.htm>, [consulta: 01-05-2012].
60. Vasilic Z., Stengl B., Drevenkar V.; Dimethylphosphorus metabolites in serum and urine of persons poisoned by malathion or thiometon; *Chem.-Biol. Interact.*; 1999; **119-120**; 479-87.
61. Sancho J.V., Pozo O.J., Hernández F.; Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in human serum and urine by coupled-column liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; 2000; **14** (16); 1485-1490.



62. Hernández F., Sancho J.V., Pozo O.J.; An estimation of the exposure to organophosphorus pesticides through the simultaneous determination of their main metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. B*; 2004; **808** (2); 229-239.
63. Salm P., Taylor P.J., Roberts D., de Silva J.; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood; *J. Chromatogr. B*; 2009; **877** (5-6); 568-574.
64. Araoud M., Douki W., Najjar M.F., Kenani A.; Simple analytical method for determination of pesticide residues in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry; *J. Environ. Sci. Health, Part B*; 2010; **45** (3); 242-248.
65. Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Vieira D.N., Lopez-Rivadulla M.; Determination of quinalphos in blood and urine by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr. B*; 2006; **832** (1); 162-168.
66. Lacassie E., Dreyfuss M.F., Gaulier J.M., Marquet P., Daguet J.L., Lachatre G.; Multiresidue determination method for organophosphorus pesticides in serum and whole blood by gas chromatography-mass-selective detection; *J. Chromatogr. B*; 2001; **759** (1); 109-116.
67. Pérez J.J., Williams M.K., Weerasekera G., Smith K., Whyatt R.M., Needham L.L., Barr D.B.; Measurement of pyrethroid, organophosphorus, and carbamate insecticides in human plasma using isotope dilution gas chromatography-high resolution mass spectrometry; *J. Chromatogr. B*; 2010; **878** (27); 2554-2562.
68. Wang Y.F., Du R.; Simultaneous extraction of trace organophosphorous pesticides from plasma sample by automated solid phase extraction and determination by gas chromatography coupled with pulsed flame photometric detector; *Forensic Sci. Int.*; 2010; **198** (1-3); 70-73.
69. Lacassie E., Marquet P., Gaulier J.M., Dreyfuss M.F., Lachatre G.; Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology; *Forensic Sci. Int.*; 2001; **121** (1-2); 116-125.
70. Gottzein A.K., Musshoff F., Doberentz E., Madea B.; Combined suicide by oxydemeton-methyl (Metasystox (R)) ingestion and hanging; *Forensic Sci. Int.*; 2009; **189** (1-3); e21-e25.
71. Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Vieira D.N., Lopez-Rivadulla M.; Solid-phase microextraction for gas chromatographic/mass spectrometric analysis of dimethoate in human biological samples; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; 2006; **20** (5); 865-869.
72. Tsoukali H., Theodoridis G., Raikos N., Grigoratou I.; Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples; *J. Chromatogr. B*; 2005; **822** (1-2); 194-200.
73. Skopp G.; Preanalytic aspects in postmortem toxicology; *Forensic Sci. Int.*; 2004; **142** (2-3); 75-100.
74. Drummer O.H.; Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology; *Anal. Bioanal. Chem.*; 2007; **388** (7); 1495-1503.
75. Ageda S., Fuke C., Ihama Y., Miyazaki T.; The stability of organophosphorus insecticides in fresh blood; *Legal Med.*; 2006; **8** (3); 144-9.

76. Heinig R., Zimmer D., Yeh S., Krol G.J.; Development, validation and application of assays to quantify metrifonate and 2,2-dichlorovinyl dimethylphosphate in human body fluids; *J. Chromatogr. B*; 2000; **741** (2); 257-269.
77. Moriya F., Hashimoto Y., Kuo T.L.; Pitfalls when determining tissue distributions of organophosphorus chemicals: Sodium fluoride accelerates chemical degradation; *J. Anal. Toxicol.*; 1999; **23** (3); 210-215.
78. Inoue S., Saito T., Mase H., Suzuki Y., Takazawa K., Yamamoto I., Inokuchi S.; Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 2007; **44** (1); 258-264.
79. John H., Worek F., Thiermann H.; LC-MS-based procedures for monitoring of toxic organophosphorus compounds and verification of pesticide and nerve agent poisoning; *Anal. Bioanal. Chem.*; 2008; **391** (1); 97-116.
80. Queiroz S.C.N., Collins C.H., Jardim I.; Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination; *Quim. Nova*; 2001; **24** (1); 68-76.
81. Pitarch E., Lopez F.J., Serrano R., Hernandez F.; Multiresidue determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in human biological fluids by capillary gas chromatography; *Fresen. J. Anal. Chem.*; 2001; **369** (6); 502-509.
82. Futagami K., Narazaki C., Kataoka Y., Shuto H., Oishi R.; Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning; *J. Chromatogr. B*; 1997; **704** (1-2); 369-373.
83. Pfeiffer P.; Determination of tri-n-butylphosphate in plasma preparations using solid-phase extraction and capillary gas-chromatography; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*; 1988; **26** (4); 229-231.
84. Liu J., Suzuki O., Kumazawa T., Seno H.; Rapid isolation with Sep-Pak C18 cartridges and wide-bore capillary gas chromatography of organophosphate pesticides; *Forensic Sci. Int.*; 1989; **41** (1-2); 67-72.
85. Fritz J.S.; Extraction: Solid-Phase Extraction, in *Encyclopedia of Analytical Science*; Volume 2; 2ª edição; Worsfold P.J., Townshend A., Poole C. (Ed.); Elsevier Academic Press: San Diego; 2005; 603-608.
86. Soriano T., Jurado C., Menendez M., Repetto M.; Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids; *J. Anal. Toxicol.*; 2001; **25** (2); 137-143.
87. Akcan R., Hilal A., Daglioglu N., Cekin N., Gulmen M.K.; Determination of pesticides in postmortem blood and bone marrow of pesticide treated rabbits; *Forensic Sci. Int.*; 2009; **189** (1-3); 82-87.
88. Liu J.T., Suzuki O.; Conditions of solid-phase extraction for the mixture of organophosphates and synthetic pyrethroids in human body fluids; *Forensic Sci. Int.*; 1999; **99** (2); 159-161.
89. Pitarch E., Serrano R., López F.J., Hernández F.; Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry; *Anal. Bioanal. Chem.*; 2003; **376** (2); 189-197.
90. Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H.; Determination of the main hydrolysis products of organophosphorus nerve agents, methylphosphonic acids, in human serum by indirect photometric detection ion chromatography; *J. Chromatogr. B*; 1997; **698** (1-2); 81-88.

91. Lacorte S., Lartiges S.B., Garrigues P., Barcelo D.; Degradation of organophosphorus pesticides and their transformation products in estuarine waters; *Environ. Sci. Technol.*; 1995; **29** (2); 431-438.
92. Lacorte S., Barcelo D.; Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated online solid-phase extraction followed by thermospray liquid-chromatography mass-spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 1995; **712** (1); 103-112.
93. Hankemeier T., Louter A.J.H., Rinkema F.D., Brinkman U.A.T.; Online coupling of solid-phase extraction and gas-chromatography with atomic-emission detection for analysis of trace pollutants in aqueous samples; *Chromatographia*; 1995; **40** (3-4); 119-124.
94. Hennion M.C.; Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography; *J. Chromatogr. A*; 1999; **856** (1-2); 3-54.
95. Arthur C.L., Pawliszyn J.; Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers; *Anal. Chem.*; 1990; **62** (19); 2145-2148.
96. Ross C., Pawliszyn J.; Extraction: Solid-Phase Microextraction, in *Encyclopedia of Analytical Science*; Volume 2; 2ª edição; Worsfold P.J., Townshend A., Poole C. (Ed.); Elsevier Academic Press: San Diego; 2005; 608-616.
97. Namera A., Yashiki M., Nagasawa N., Iwasaki Y., Kojima T.; Rapid analysis of malathion in blood using head space solid phase microextraction and selected ion monitoring; *Forensic Sci. Int.*; 1997; **88** (2); 125-131.
98. Musshoff F., Junker H., Madea B.; Rapid analysis of parathion in biological samples using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS); *Clin. Chem. Lab. Med.*; 1999; **37** (6); 639-642.
99. López F.J., Pitarch E., Egea S., Beltran J., Hernández F.; Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction; *Anal. Chim. Acta*; 2001; **433** (2); 217-226.
100. Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Vieira D.N., López-Rivadulla M.; Determination of parathion in biological fluids by means of direct solid-phase microextraction; *Anal. Bioanal. Chem.*; 2006; **386** (6); 1717-1726.
101. Beltran J., Pitarch E., Egea S., López F.J., Hernández F.; Gas chromatographic determination of selected pesticides in human serum by head-space solid-phase microextraction; *Chromatographia*; 2001; **54** (11-12); 757-763.
102. Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce; *J. AOAC Int.*; 2003; **86** (2); 412-431.
103. Wilkowska A., Biziuk M.; Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology; *Food Chem.*; 2011; **125** (3); 803-812.
104. Prestes O.D., Friggi C.A., Adaime M.B., Zanella R.; QuEChERS - A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry; *Quim. Nova*; 2009; **32** (6); 1620-1634.
105. Lehotay S.J., de Kok A., Hiemstra M., van Bodegraven P.; Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection; *J. AOAC Int.*; 2005; **88** (2); 595-614.

106. Su R., Xu X., Wang X., Li D., Li X., Zhang H., Yu A.; Determination of organophosphorus pesticides in peanut oil by dispersive solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr. B*; 2011; **879** (30); 3423-8.
107. Paya P., Anastassiades M., Mack D., Sigalova I., Tasdelen B., Oliva J., Barba A.; Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection; *Anal. Bioanal. Chem.*; 2007; **389** (6); 1697-1714.
108. Hunter R.E.J., Riederer A.M., Ryan P.B.; Method for the determination of organophosphorus and pyrethroid pesticides in food via gas chromatography with electron-capture detection; *J. Agric. Food Chem.*; 2010; **58** (3); 1396-1402.
109. Castillo M., Gonzalez C., Miralles A.; An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS; *Anal. Bioanal. Chem.*; 2011; **400** (5); 1315-1328.
110. Blasco C., Vazquez-Roig P., Onghena M., Masia A., Pico Y.; Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures; *J. Chromatogr. A*; 2011; **1218** (30); 4892-4901.
111. Nolan R.J., Rick D.L., Freshour N.L., Saunders J.H.; Chlorpyrifos - pharmacokinetics in human volunteers; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 1984; **73** (1); 8-15.
112. Kojima T., Yashiki M., Ohtani M., Chikasue F., Miyazaki T.; Determination of dimethoate in blood and hemoperfusion cartridge following ingestion of formothion - a case-study; *Forensic Sci. Int.*; 1990; **48** (1); 79-88.
113. Yashiki M., Kojima T., Ohtani M., Chikasue F., Miyazaki T.; Determination of Disulfoton and its metabolites in the body-fluids of a Di-Syston<sup>®</sup> intoxication case; *Forensic Sci. Int.*; 1990; **48** (2); 145-154.
114. Richardson E.R., Seiber J.N.; Gas chromatographic determination of organophosphorus insecticides and their dialkyl phosphate metabolites in liver and kidney samples; *J. Agric. Food Chem.*; 1993; **41** (3); 416-422.
115. Lee X.P., Kumazawa T., Sato K., Suzuki O.; Detection of organophosphate pesticides in human body fluids by headspace solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection; *Chromatographia*; 1996; **42** (3-4); 135-140.
116. Cho Y., Matsuoka N., Kamiya A.; Determination of organophosphorus pesticides in biological samples of acute poisoning by HPLC with diode-array detector; *Chem. Pharm. Bull.*; 1997; **45** (4); 737-740.
117. Tarbah F.A., Mahler H., Temme O., Daldrup T.; An analytical method for the rapid screening of organophosphate pesticides in human biological samples and foodstuffs; *Forensic Sci. Int.*; 2001; **121** (1-2); 126-133.
118. Hernández F., Pitarch E., Beltran J., López F.J.; Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood; *J. Chromatogr. B*; 2002; **769** (1); 65-77.
119. Musshoff F., Junker H., Madea B.; Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection; *J. Chromatogr. Sci.*; 2002; **40** (1); 29-34.

120. Russo M.V., Campanella L., Avino P.; Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissues by capillary gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry analysis; *J. Chromatogr. B*; 2002; **780** (2); 431-441.
121. Pavlic M., Haidekker A., Grubwieser P., Rabl W.; Fatal intoxication with omethoate; *Int. J. Legal Med.*; 2002; **116** (4); 238-241.
122. Akgur S.A., Ozturk P., Yemiscigil A., Ege B.; Rapid communication: postmortem distribution of organophosphate insecticides in human autopsy tissues following suicide; *J. Toxicol. Environ. Health A*; 2003; **66** (23); 2187-2191.
123. Tsoukali H., Raikos N., Theodoridis G., Psaroulis D.; Headspace solid phase microextraction for the gas chromatographic analysis of methyl-parathion in post-mortem human samples; *Forensic Sci. Int.*; 2004; **143** (2-3); 127-132.
124. Bicker W., Lammerhofer M., Genser D., Kiss H., Lindner W.; A case study of acute human chlorpyrifos poisoning: Novel aspects on metabolism and toxicokinetics derived from liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine samples; *Toxicol. Lett.*; 2005; **159** (3); 235-251.
125. Kasiotis K.M., Souki H., Tsakirakis A.N., Carageorgiou H., Theotokatos S.A., Haroutounian S.A., Machera K.; Headspace solid phase micro extraction gas chromatographic determination of fenthion in human serum; *Int. J. Mol. Sci.*; 2008; **9** (5); 906-913.
126. Inoue S., Saito T., Miyazawa T., Mase H., Inokuchi S.; A simple method for detecting fenitrothion, its metabolite 3-methyl-4-nitrophenol, and other organophosphorus pesticides in human urine by LC-MS; *Forensic Toxicol.*; 2009; **27** (1); 32-36.
127. Kasiotis K.M., Souki H., Carageorgiou H., Machera K.; Determination of dimethoate and omethoate in human serum samples. Risk assessment for the operator; *Int. J. Environ. Anal. Chem.*; 2011; **91** (9); 876-883.
128. Wielgomas B., Czarnowski W.; Headspace single-drop microextraction and GC-ECD determination of chlorpyrifos-ethyl in rat liver; *Anal. Bioanal. Chem.*; 2008; **390** (7); 1933-1941.
129. Uddin R., Iqbal S., Khan M.F., Parveen Z., Ahmed M., Abbas M.; Determination of Pesticide Residues in Rice Grain by Solvent Extraction, Column Cleanup, and Gas Chromatography-Electron Capture Detection; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; 2011; **86** (1); 83-89.
130. Scott R.P.W.; Electron-Capture Detector, in *Encyclopedia of Chromatography*; Volume 1; 3ª edição; Cazes J. (Ed.); CRC Press: Boca Raton; 2010; 704-705.
131. Poole C.F.; Gas Chromatography: Detectors, in *Encyclopedia of Analytical Science*; Volume 4; 2ª edição; Worsfold P.J., Townshend A., Poole C. (Ed.); Elsevier Academic Press: San Diego; 2005; 95-105.
132. Harvey D.J.; Gas Chromatography: Mass Spectrometry, in *Encyclopedia of Analytical Science*; Volume 4; 2ª edição; Worsfold P.J., Townshend A., Poole C. (Ed.); Elsevier Academic Press: San Diego; 2005; 106-116.
133. Scott R.P.W.; GC/MS Systems, in *Encyclopedia of Chromatography*; Volume 2; 3ª edição; Cazes J. (Ed.); CRC Press: Boca Raton; 2010; 976-981.
134. Hong J., Kim D.G., Paeng K.J.; Electron impact fragmentations of chlorinated organophosphorus pesticides; *Bull. Korean Chem. Soc.*; 2000; **21** (8); 785-792.
135. NIST; [Em linha]; Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>; [consulta: 13-10-2012].

136. Instituto Português da Qualidade (IPQ); NP EN ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração; 2005.
137. Performance Parameters, Calculations and Tests, Cap. 2, *in* Method Validation in Pharmaceutical Analysis - A Guide to Best Practice; Ermer J., Miller J.H.M. (Ed.); Wiley-VCH: Weinheim; 2005; 21-194.
138. Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses I.P.; Procedimento Técnico: Validação de Ensaio Intralaboratorial, Rev01; 2012.
139. EURACHEM; The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics; 1998.
140. Ermer J.; Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 2001; **24** (5-6); 755-767.
141. Persson B.A., Vessman J.; The use of selectivity in analytical chemistry - some considerations; *Trac-Trends Anal. Chem.*; 2001; **20** (10); 526-532.
142. Vessman J., Stefan R.I., Van Staden J.F., Danzer K., Lindner W., Burns D.T., Fajgelj A., Muller H.; Selectivity in analytical chemistry - (IUPAC Recommendations 2001); *Pure Appl. Chem.*; 2001; **73** (8); 1381-1386.
143. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM); International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM); 2012.
144. RELACRE; Guia RELACRE 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química; 2000.
145. Hughes N.C., Wong E.Y.K., Fan J., Bajaj N.; Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays; *AAPS J.*; 2007; **9** (3); E353-E360.
146. Bansal S., DeStefano A.; Key elements of bioanalytical method validation for small molecules; *AAPS J.*; 2007; **9** (1); E109-E114.
147. Garofolo F.; Bioanalytical Method Validation, Cap. 8, *in* Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification; Chan C.C., Lam H., Lee Y.C., Zhang X.-M. (Ed.); Wiley-Interscience: Hoboken; 2004; 105-138.
148. Royal Society of Chemistry - AMC technical brief; Terminology - the key to understanding analytical science. Part 1: Accuracy, precision and uncertainty; 2003.
149. International Organization for Standardization (ISO); ISO 5725: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results; 1994.
150. Instituto Português de Acreditação (IPAC); Guia para quantificação de incerteza em ensaios químicos; 2007; Disponível em: <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC007.pdf>, [consulta: 25-10-2012].
151. Fritz J.S., Dumont P.J., Schmidt L.W.; Methods and materials for solid-phase extraction; *J. Chromatogr. A*; 1995; **691** (1-2); 133-140.
152. WADA Laboratory Committee; TD2010IDCR - Identification criteria for qualitative assays incorporating column chromatography and mass spectrometry; 2010, [consulta: 20-10-2012].
153. Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses I.P.; Registo: Rastreio por GC – Conformidade do tempo de retenção e do tempo de retenção relativo, Rev00.
154. Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses I.P.; Registo: Confirmação Qualitativa, Rev02.

155. Singtoroj T., Tarning J., Annerberg A., Ashton M., Bergqvist Y., White N.J., Lindegardh N., Day N.P.J.; A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 2006; **41** (1); 219-227.
156. International Organization for Standardization (ISO); ISO 8466-1: Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics (Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function); 1990.
157. Appendix A: Statistical Tables, *in* Basic Statistics; 4ª edição; Dunn O.J., Clark V.A. (Ed.); John Wiley & Sons: Nova Jérсия; 2009; 219-233.
158. Almeida A.M., Castel-Branco M.M., Falcao A.C.; Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods; *J. Chromatogr. B*; 2002; **774** (2); 215-222.
159. de Levie R.; When, why, and how to use weighted least-squares; *J. Chem. Educ.*; 1986; **63** (1); 10-15.
160. Maroto A., Boque R., Riu J., Rius F.X.; Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples; *Anal. Chim. Acta*; 2001; **446** (1-2); 133-145.
161. Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses I.P.; Procedimento Técnico: Estimativa da incerteza de resultados, Rev00; 2011.

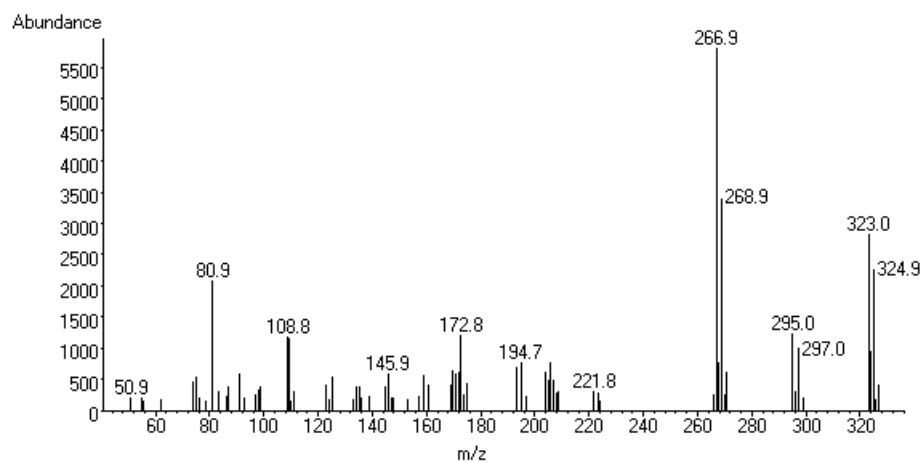




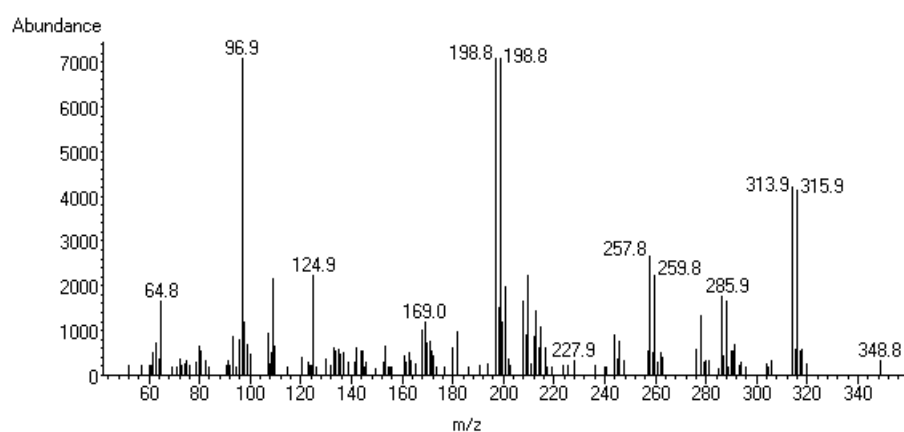
## Anexos

### Anexo A – Espectros de Massa em modo SCAN

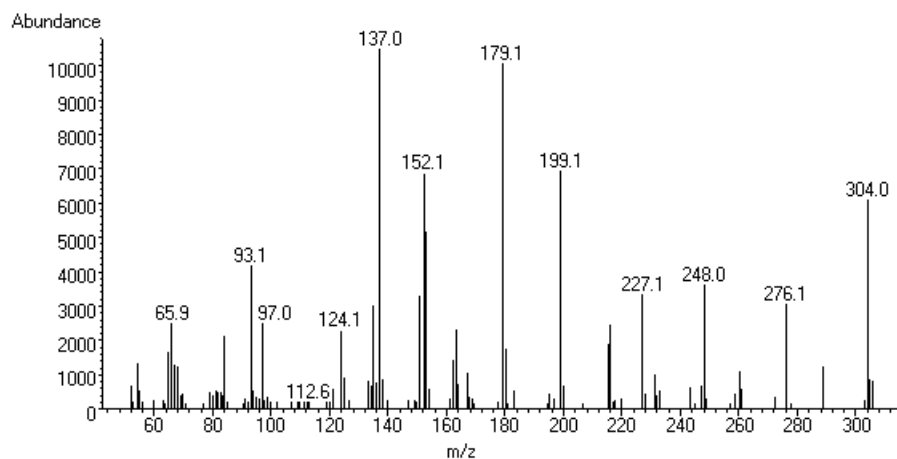
#### Clorfenvinfos

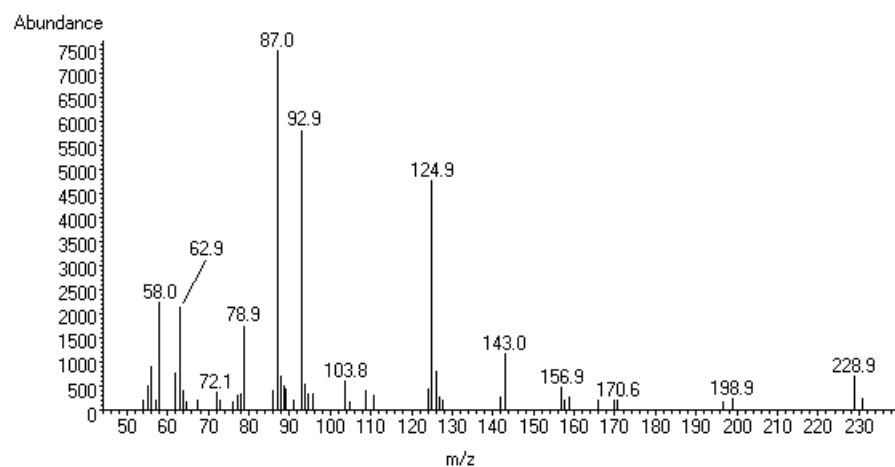
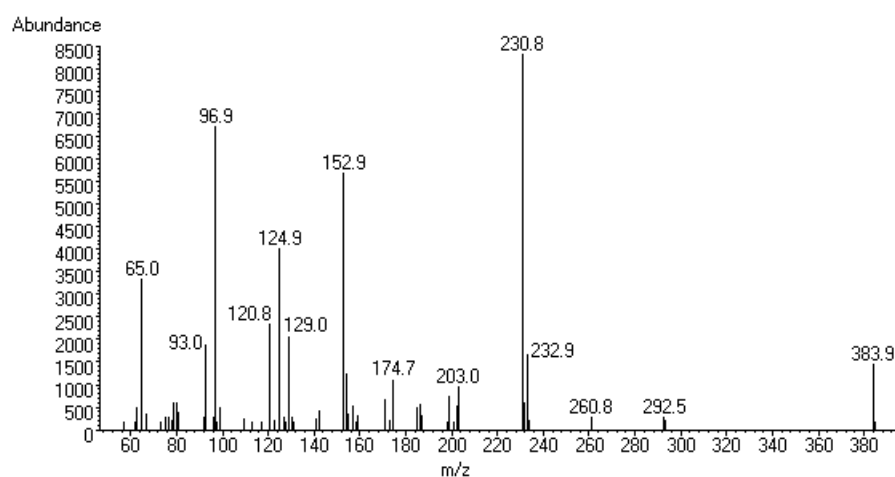
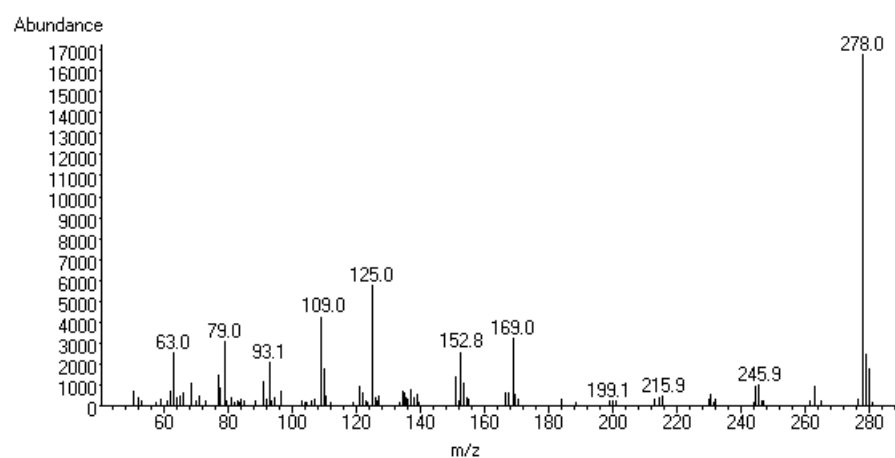


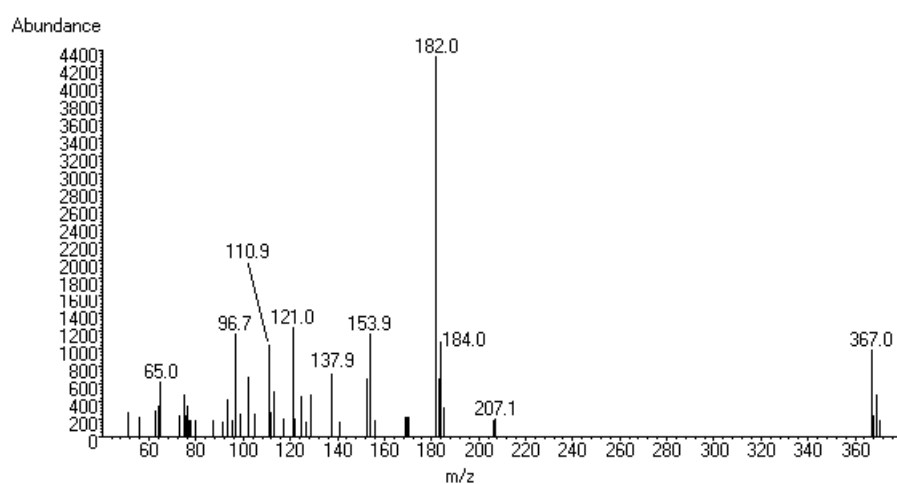
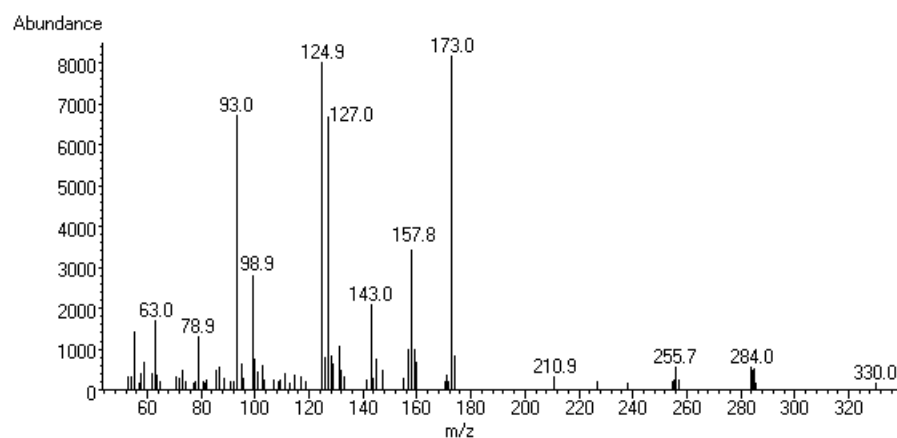
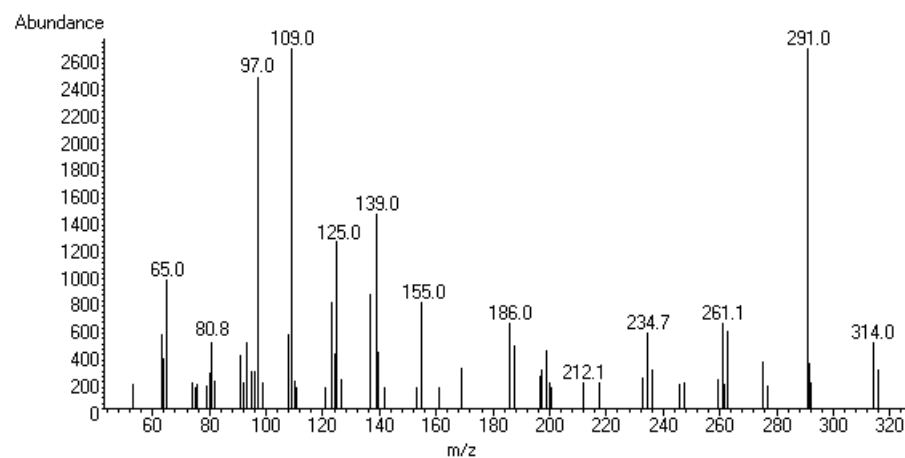
#### Clorpirifos

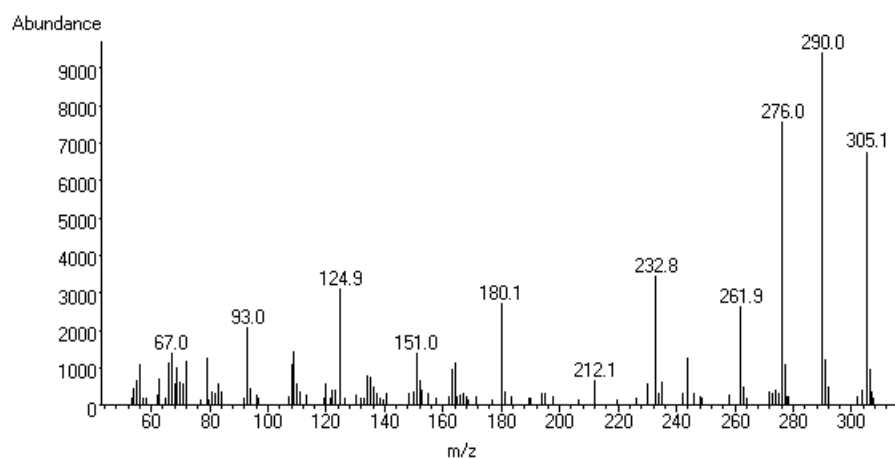
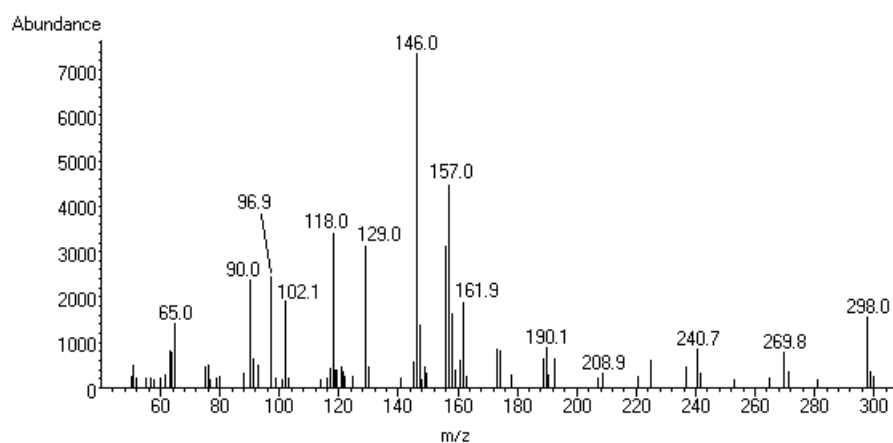


#### Diazinão



**Dimetoato****Etião (padrão interno)****Fentião**

**Fosalona****Malatião****Paratião**

**Pirimifos-metilo****Quinalfos**

## Anexo B – Estudo da Homocedasticidade em GC-ECD em gamas de trabalho mais curtas

Foram estudadas as variâncias das razões  $A_P/A_{PI}$  de amostras fortificadas a 50 ng/mL ( $s_{inf}^2$ ), a 1000 ng/mL ( $s_{sup1}^2$ ) e a 2000 ng/mL ( $s_{sup2}^2$ ), e realizados os testes *PG* entre  $s_{inf}^2$  e  $s_{sup1}^2$  ( $s_{sup1}^2/s_{inf}^2$ ), e entre  $s_{sup2}^2$  e  $s_{inf}^2$  ( $s_{sup2}^2/s_{inf}^2$ ). No caso do pirimifos-metilo, dada a menor sensibilidade do detetor para este IOF e o facto de a gama já ser suficientemente curta, só foram estudadas as variâncias de amostras fortificadas a 500 ng/mL ( $s_{inf}^2$ ) e 2500 ng/mL ( $s_{sup2}^2$ ), e a razão entre estas. Este estudo só foi realizado em GC-ECD porque os 2 detetores apresentaram um comportamento idêntico ao longo de todo o trabalho, e por essa razão considerou-se suficiente realizá-lo apenas num.

Valores do teste *PG* para gamas de trabalho mais curtas

Inseticida	50 ng/mL	1000 ng/mL		2000 ng/mL	
	$s_{inf}^2$	$s_{sup1}^2$	$s_{sup1}^2/s_{inf}^2$	$s_{sup2}^2$	$s_{sup2}^2/s_{inf}^2$
Clorfenvinfos	$6,00 \times 10^{-5}$	$7,25 \times 10^{-3}$	120,92	$5,01 \times 10^{-2}$	835,05
Clorpirifos	$5,10 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-2}$	421,41	$5,76 \times 10^{-2}$	1128,66
Diazinão	$1,78 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{-4}$	168,28	$1,29 \times 10^{-3}$	725,22
Dimetoato	$5,34 \times 10^{-6}$	$2,06 \times 10^{-3}$	386,51	$1,24 \times 10^{-2}$	2324,80
Fosalona	$4,53 \times 10^{-5}$	$1,18 \times 10^{-2}$	259,94	$1,32 \times 10^{-1}$	2922,03
Malatião	$5,84 \times 10^{-6}$	$9,34 \times 10^{-4}$	159,85	$5,15 \times 10^{-3}$	881,13
Paratião	$2,10 \times 10^{-5}$	$3,42 \times 10^{-3}$	163,09	$1,37 \times 10^{-2}$	654,26
Pirimifos-metilo	$2,07 \times 10^{-7}$	-	-	$4,07 \times 10^{-6}$	19,62
Quinalfos	$1,99 \times 10^{-7}$	$2,88 \times 10^{-5}$	145,09	$1,85 \times 10^{-4}$	933,93

## Anexo C – Regressão Linear Ponderada: Parâmetros das curvas de calibração

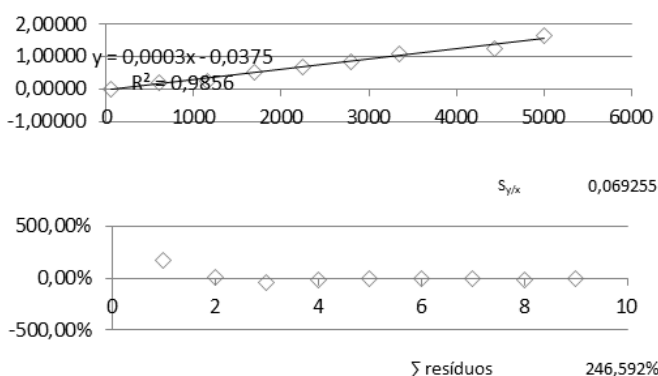
### Exemplo da aplicação da Folha de “Registo: Estudo da Regressão Linear Ponderada”

Tecnologia: GC-ECD  
 Operador: Nuno Valente / André Castro  
 Data: 31-05-2012

Substância: Dimetoato PI: Etião  
 lão: n.a. lão: n.a.

#### Função linear simples ( $w = 1$ )

[ ] (ng/mL)	Área		
	Padrão	P. Interno	Razão
50	49537564	6922874601	0,00716
600	1343316734	6933869726	0,19373
1150	1496982555	6327261389	0,23659
1700	2441374082	4867449610	0,50157
2250	3885924776	5703364674	0,68134
2800	5427347549	6315222316	0,85941
3350	6060213763	5698692998	1,06344
4440	9179297961	7317615062	1,25441
5000	9347695866	5712607246	1,63633



#### Função linear ponderada ( $w = 1/x$ )

Eq. ( $y = a + b.x$ )	$\sum \text{resíduos}$	76,532%
a	-0,010057	
b	0,000306	
$S_{y/x}$	0,072328	
$r^2$	0,990670	



#### Função linear ponderada ( $w = 1/x^2$ )

$\sum$ resíduos	68,375%	Eq. (y = a + b.x)	
		a	-0,007827
		b	0,000300
		$S_{y/x}$	0,077499
		$r^2$	0,984578



#### Função linear ponderada ( $w = 1/x^{1/2}$ )

Eq. ( $y = a + b.x$ )	$\sum \text{resíduos}$	126,920%
a	-0,018240	
b	0,000310	
$S_{y/x}$	0,070430	
$r^2$	0,990055	



#### Função linear ponderada ( $w = 1/y$ )

$\sum$ resíduos	76,406%	Eq. ( $y = a + b.x$ )	
		a	-0,009442
		b	0,000302
		$S_{y/x}$	0,074785
		$r^2$	0,988761



#### Função linear ponderada ( $w = 1/y^2$ )

Eq. ( $y = a + b.x$ )	$\sum \text{resíduos}$	89,121%
a	-0,007195	
b	0,000287	
$S_{y/x}$	0,100791	
$r^2$	0,975135	



#### Função linear ponderada ( $w = 1/y^{1/2}$ )

$\sum$ residuos	121,594%	Eq. ( $y = a + b.x$ )	
		a	-0,017180
		b	0,000309
		$S_{y/x}$	0,070851
		$r^2$	0.989973



**Estudo da Regressão Linear Ponderada em GC-ECD**

$w_i$		CLF	CLP	DIA	DIM	FOS	MAL	PAR	PIR	QUI
<b>1</b>	b	0,8349	0,7019	0,0824	0,3173	0,9391	0,2609	0,3792	0,0186	0,0453
	a	-0,0855	-0,0585	-0,0007	-0,0375	-0,3418	-0,0633	-0,0438	-0,0075	-0,0083
	r	0,9942	0,9952	0,9970	0,9928	0,9904	0,9924	0,9968	0,9979	0,9957
<b>1/x</b>	b	0,8050	0,6781	0,0824	0,3057	0,8176	0,2383	0,3622	0,0181	0,0424
	a	-0,0163	-0,0023	-0,0008	-0,0101	-0,0464	-0,0097	-0,0045	-0,0060	-0,0016
	r	0,9962	0,9975	0,9974	0,9953	0,9881	0,9923	0,9973	0,9980	0,9956
<b>1/x<sup>2</sup></b>	b	0,7890	0,6546	0,0802	0,2996	0,7289	0,2184	0,3467	0,0176	0,0399
	a	-0,0105	0,0063	0,0000	-0,0078	-0,0139	-0,0025	0,0011	-0,0051	-0,0007
	r	0,9942	0,9958	0,9936	0,9923	0,9772	0,9825	0,9941	0,9978	0,9901
<b>1/√x</b>	b	0,8173	0,6890	0,0828	0,3105	0,8686	0,2484	0,3697	0,0183	0,0436
	a	-0,0373	-0,0222	-0,0017	-0,0182	-0,1384	-0,0279	-0,0179	-0,0067	-0,0038
	r	0,9959	0,9971	0,9977	0,9950	0,9899	0,9934	0,9975	0,9980	0,9962
<b>1/y</b>	b	0,7988	0,6761	0,0821	0,3024	0,7940	0,2343	0,3608	0,0179	0,0419
	a	-0,0160	-0,0046	-0,0011	-0,0094	-0,0408	-0,0101	-0,0058	-0,0056	-0,0014
	r	0,9957	0,9973	0,9971	0,9944	0,9852	0,9899	0,9969	0,9980	0,9947
<b>1/y<sup>2</sup></b>	b	0,7664	0,6441	0,0780	0,2867	0,6460	0,1974	0,3378	0,0172	0,0379
	a	-0,0094	0,0065	0,0001	-0,0072	-0,0093	-0,0015	0,0014	-0,0048	-0,0005
	r	0,9919	0,9952	0,9917	0,9875	0,9676	0,9710	0,9924	0,9976	0,9857
<b>1/√y</b>	b	0,8151	0,6887	0,0828	0,3090	0,8587	0,2473	0,3697	0,0183	0,0435
	a	-0,0373	-0,0248	-0,0021	-0,0172	-0,1274	-0,0282	-0,0195	-0,0064	-0,0036
	r	0,9958	0,9971	0,9976	0,9950	0,9894	0,9930	0,9974	0,9981	0,9961

CLF – Clorfenvinfos; CLP – Clorpirifos; DIA – Diazinão; DIM – Dimetoato; FEN – Fentão; FOS – Fosalone; MAL – Malatão; PAR – Paratão; PIR – Pirimifos-metilo; QUI – Quinalfos.

**Estudo da Regressão Linear Ponderada em GC-MS-SIM**

$w_i$		CLF	CLP	DIA	DIM	FEN	FOS	MAL	PAR	PIR	QUI
<b>1</b>	b	0,4097	0,2288	0,2288	0,3446	0,5891	0,4559	0,3551	0,1598	0,3131	0,3520
	a	-0,1027	-0,0480	-0,0290	-0,0603	-0,1662	-0,1258	-0,1095	-0,0239	-0,0184	-0,0948
	r	0,9951	0,9951	0,9916	0,9942	0,9929	0,9941	0,9964	0,9976	0,9968	0,9930
<b><math>1/x</math></b>	b	0,3744	0,2106	0,2196	0,3254	0,5302	0,4131	0,3095	0,1532	0,3092	0,3204
	a	-0,0191	-0,0050	-0,0058	-0,0149	-0,0264	-0,0216	-0,0146	-0,0060	-0,0081	-0,0149
	r	0,9925	0,9953	0,9951	0,9941	0,9911	0,9908	0,9924	0,9969	0,9978	0,9927
<b><math>1/x^2</math></b>	b	0,3416	0,1971	0,2082	0,3033	0,4809	0,3724	0,2844	0,1451	0,3019	0,2944
	a	-0,0071	0,0000	-0,0013	-0,0068	-0,0084	-0,0067	-0,0045	-0,0030	-0,0054	-0,0044
	r	0,9806	0,9914	0,9893	0,9849	0,9801	0,9778	0,9825	0,9888	0,9939	0,9823
<b><math>1/\sqrt{x}</math></b>	b	0,3906	0,2183	0,2243	0,3350	0,5562	0,4331	0,3225	0,1563	0,3112	0,3340
	a	-0,0484	-0,0186	-0,0154	-0,0326	-0,0731	-0,0586	-0,0400	-0,0126	-0,0126	-0,0415
	r	0,9945	0,9956	0,9948	0,9952	0,9928	0,9933	0,9934	0,9978	0,9979	0,9938
<b><math>1/y</math></b>	b	0,3666	0,2090	0,2176	0,3202	0,5185	0,4034	0,3040	0,1518	0,3078	0,3150
	a	-0,0176	-0,0055	-0,0065	-0,0135	-0,0247	-0,0204	-0,0144	-0,0058	-0,0080	-0,0150
	r	0,9892	0,9947	0,9940	0,9920	0,9882	0,9873	0,9900	0,9955	0,9974	0,9902
<b><math>1/y^2</math></b>	b	0,3022	0,1899	0,1968	0,2764	0,4291	0,3270	0,2555	0,1341	0,2921	0,2634
	a	-0,0050	0,0003	-0,0008	-0,0053	-0,0057	-0,0043	-0,0030	-0,0024	-0,0048	-0,0029
	r	0,9657	0,9895	0,9837	0,9744	0,9684	0,9639	0,9694	0,9770	0,9910	0,9677
<b><math>1/\sqrt{y}</math></b>	b	0,3882	0,2179	0,2238	0,3333	0,5523	0,4303	0,3208	0,1559	0,3109	0,3324
	a	-0,0461	-0,0192	-0,0162	-0,0310	-0,0700	-0,0569	-0,0393	-0,0123	-0,0129	-0,0411
	r	0,9939	0,9955	0,9946	0,9949	0,9923	0,9926	0,9931	0,9976	0,9979	0,9935

CLF – Clorfenvinfos; CLP – Clorpirifos; DIA – Diazinão; DIM – Dimetoato; FEN – Fentião; FOS – Fosalona; MAL – Malatão; PAR – Paratão; PIR – Pirimifos-metilo; QUI – Quinalfos.



## Anexo D – Resultados das Séries para o estudo da Exatidão

### Clorfenvinfos

#### GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	417,22	632,77	526,64	622,59	671,41	617,80	495,25	383,15
	413,93	594,84	612,86	635,07	706,61	599,95	598,49	384,30
	415,76	610,49	587,04	673,02	730,40	717,50	557,95	405,96
<b>4000 ng/mL</b>	4217,30	4322,84	3595,96	4170,76	3876,67	3799,31	5419,44	4212,98
	4671,30	4498,64	3926,58	4309,99	3855,34	3877,24	4299,77	4419,29
	4518,93	4861,40	3727,36	4229,68	3971,49	3950,28	4537,00	4898,11

#### GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	498,87	601,03	411,13	596,79	558,52	584,56	527,82	435,02
	473,23	544,30	460,92	614,29	627,11	550,45	446,12	446,56
	479,23	588,20	438,78	605,20	620,53	583,09	448,22	463,17
<b>4000 ng/mL</b>	3788,12	4614,11	4479,55	4479,01	3774,53	4053,59	3985,02	3851,24
	3657,79	4980,42	3205,43	4309,73	3843,96	4016,67	3877,34	4121,27
	4094,25	4937,82	3421,94	4139,77	4181,18	4206,53	4284,99	4417,16

### Clorpirifos

#### GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	421,76	618,24	513,70	552,98	586,96	585,32	528,65	449,32
	388,81	602,84	604,69	558,81	674,12	594,92	479,50	443,32
	414,33	577,86	479,15	585,90	624,81	597,43	560,35	472,75
<b>4000 ng/mL</b>	3833,40	4412,75	3537,86	3882,03	3764,90	3754,76	3614,50	3981,01
	3569,05	4070,98	3996,79	3435,14	3813,21	4088,22	4101,64	4253,10
	3877,81	4350,51	3244,27	3740,39	3877,59	3731,57	4396,00	3884,86

#### GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	444,05	608,34	257,01	530,99	606,21	570,63	583,46	514,81
	425,79	540,15	388,78	575,99	691,29	572,52	459,85	527,71
	436,12	589,61	326,65	555,66	648,80	611,13	480,28	557,44
<b>4000 ng/mL</b>	3870,19	4597,14	3333,11	3697,23	3550,52	4241,60	3601,25	3986,73
	3501,90	4974,96	3545,37	3461,07	3838,66	4399,64	4206,89	4410,54
	3751,88	4336,81	3118,15	3849,71	3900,80	4064,08	4501,39	3829,63

**Diazinão**

## GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	380,33	643,70	646,81	521,74	577,84	574,74	495,16	525,61
	355,80	589,74	709,48	571,72	689,39	635,30	378,61	455,14
	369,65	577,70	614,89	527,68	658,50	609,95	422,88	481,87
<b>4000 ng/mL</b>	3608,06	4329,90	3716,56	4114,38	4004,66	3762,72	3971,27	3624,05
	3423,06	4602,89	3803,29	3886,36	4178,18	4079,76	4042,15	4083,02
	3390,35	4266,33	3271,58	4127,50	4175,14	3625,20	3437,07	3370,75

## GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	444,65	645,06	362,11	530,11	561,99	656,00	513,47	459,49
	412,46	521,61	388,87	596,32	650,38	615,93	450,94	456,11
	428,27	603,89	323,96	519,85	644,63	637,48	528,23	489,05
<b>4000 ng/mL</b>	4021,83	4445,22	3506,76	4219,28	3438,53	3767,56	3643,99	3782,71
	3367,58	5095,58	3336,31	3880,36	3716,42	3788,05	4346,45	4039,25
	3987,34	4574,72	3320,81	4168,22	4020,10	3837,60	3692,04	3559,58

**Dimetoato**

## GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	379,52	637,23	565,37	570,87	552,25	564,10	530,09	607,95
	375,61	572,10	639,93	572,18	628,25	570,94	478,66	498,03
	380,47	585,54	564,71	571,59	596,48	592,47	486,76	521,31
<b>4000 ng/mL</b>	3602,73	4447,92	4410,37	5169,52	4504,31	4007,00	5179,93	3375,15
	3929,32	4771,48	4872,54	5015,32	4378,84	4187,61	4959,91	4097,03
	3781,60	5115,40	4892,53	5175,45	4383,49	4033,96	4608,93	4351,17

## GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	511,53	579,65	456,36	602,80	564,16	559,55	777,75	726,26
	505,33	510,19	483,92	608,05	629,96	548,42	498,77	619,82
	520,78	580,13	455,00	585,86	623,71	559,91	463,96	643,10
<b>4000 ng/mL</b>	3691,62	4827,92	4783,66	4408,64	4568,10	3747,26	4574,53	3864,08
	3808,47	5363,13	3634,78	5234,01	4710,51	3608,91	4340,80	4213,57
	4546,42	5361,12	3748,54	4640,33	4467,71	4000,72	3942,04	4223,80

**Fentão**

## GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	375,80	612,25	513,58	554,31	618,43	589,63	526,27	393,84
	365,50	545,05	615,72	561,20	671,55	594,35	343,40	385,69
	356,27	577,62	528,54	575,19	651,69	598,64	542,08	418,72
<b>4000 ng/mL</b>	3915,55	4440,21	3411,41	4075,13	3718,91	3734,65	4380,13	4146,22
	3605,16	4427,78	3743,83	3738,21	3828,37	3808,88	4370,88	4436,78
	3536,27	4276,68	3132,13	4183,22	3872,02	3600,93	4903,66	4040,70

**Fosalona**

## GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	370,37	590,96	528,98	603,29	581,11	587,42	547,21	407,43
	393,34	600,05	566,52	618,52	605,23	566,68	620,74	372,12
	377,70	574,41	605,84	651,02	599,82	590,71	601,48	410,47
<b>4000 ng/mL</b>	3984,88	4332,62	3492,92	4314,18	3747,66	4090,24	5351,91	4174,52
	3969,06	4412,53	3438,22	3967,72	3740,44	4050,19	4455,03	4389,93
	3952,46	4415,20	3412,55	4236,95	3957,28	4010,07	5288,99	4439,07

## GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	429,19	565,07	564,03	600,91	566,20	602,75	591,64	625,72
	396,60	533,98	551,45	628,12	636,22	588,24	519,40	629,35
	403,28	549,26	522,37	637,57	626,58	599,82	571,07	645,71
<b>4000 ng/mL</b>	3939,39	4918,45	3369,19	4045,43	3847,54	4275,00	4310,73	4032,25
	3537,95	4956,40	3586,98	3785,16	4195,11	4263,19	4469,69	4182,92
	4159,97	4844,86	3400,40	4086,01	4269,20	4158,64	5034,90	4147,73

**Malatão**

## GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	411,88	628,95	565,39	579,73	555,15	570,81	496,37	470,62
	378,04	567,51	647,27	589,23	635,04	562,79	486,00	461,03
	384,63	594,57	553,56	595,19	621,82	574,65	490,50	482,61
<b>4000 ng/mL</b>	3904,73	4352,46	3534,37	4193,90	4107,70	4053,01	4993,59	3988,26
	4012,82	4670,02	3820,30	4399,34	3958,40	4186,41	4533,22	4221,95
	4182,30	4897,77	3710,47	4372,21	4258,61	4222,28	4547,75	4509,76

## GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	463,57	644,28	444,35	555,73	566,70	561,28	624,39	597,87
	438,06	554,77	460,46	574,15	644,76	543,08	559,23	567,29
	432,33	604,84	437,42	547,47	636,39	577,30	534,82	580,58
<b>4000 ng/mL</b>	3816,67	4719,89	4475,99	4286,39	4075,26	4026,89	3773,05	3970,22
	3456,10	5192,76	3217,28	4112,76	4189,84	4079,63	3905,09	4309,03
	4518,05	5198,83	3386,18	3950,73	4633,73	4301,86	4100,87	4381,73

**Paratião**

## GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	430,31	580,12	561,98	578,29	591,40	565,05	539,20	534,40
	369,41	535,78	611,20	587,39	638,29	573,34	490,18	523,85
	413,21	550,66	563,72	601,94	629,60	580,54	501,15	529,61
<b>4000 ng/mL</b>	4611,35	4259,31	3284,27	4047,62	3878,23	3810,19	4419,54	4429,79
	4324,19	4351,11	3783,22	3742,75	3928,31	4052,20	4318,74	4638,11
	4242,44	4349,81	3332,19	4147,88	4070,00	3803,81	4537,28	4094,55

## GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	458,24	603,67	351,87	577,19	586,84	575,19	617,93	507,99
	431,28	530,69	417,44	605,97	666,19	559,43	555,63	494,88
	433,89	593,20	351,25	582,41	649,47	608,79	558,73	530,69
<b>4000 ng/mL</b>	3798,34	4621,31	3215,81	3986,37	3576,57	4122,41	3867,73	3757,74
	3426,62	4860,92	3378,30	3700,71	3870,03	4117,88	4065,18	4152,29
	3873,23	4564,95	3142,69	4005,34	3998,86	4041,78	4158,17	3849,28

**Pirimifos-metilo**

## GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	342,92	585,07	610,16	642,47	600,23	569,43	550,67	496,88
	408,79	515,55	776,08	510,96	638,96	593,98	475,76	473,89
	345,34	564,22	383,32	522,39	594,23	619,19	427,07	479,87
<b>4000 ng/mL</b>	4091,42	4485,24	3506,66	3686,23	3717,23	3756,97	4185,69	3737,91
	4066,40	4911,77	3548,01	3601,99	3827,89	3906,64	4593,61	4205,81
	3356,84	4524,21	3177,66	4009,59	3680,82	3625,89	4523,62	3861,56

## GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	430,82	556,38	585,76	706,50	626,02	590,59	617,56	525,24
	475,14	467,81	564,12	553,37	693,28	580,49	552,83	517,90
	448,48	530,00	584,08	484,85	604,23	655,16	599,87	522,22
<b>4000 ng/mL</b>	3891,26	4612,84	3216,18	3688,36	3618,68	3786,00	3817,49	3623,90
	3567,80	5061,99	3243,05	3687,20	3931,79	3927,04	3931,06	4190,57
	3445,64	4428,59	3168,37	4052,07	3704,54	3752,36	4206,77	3767,27

**Quinalfos**

## GC-MS-SIM

Nível	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8
<b>600 ng/mL</b>	417,47	613,00	548,65	597,50	572,68	578,07	541,33	402,75
	408,30	600,36	590,44	631,30	624,14	605,20	605,06	397,05
	412,55	596,82	550,15	627,06	623,18	583,59	600,33	430,81
<b>4000 ng/mL</b>	4390,02	4279,93	3315,49	4305,54	3667,48	3728,24	5011,57	4232,08
	4027,90	4249,13	3840,98	3979,41	3846,14	3855,92	4405,83	4450,10
	3987,43	4238,12	3227,91	4315,53	3861,11	3847,68	4843,85	4292,95

## GC-ECD

<b>600 ng/mL</b>	441,73	579,11	357,41	590,38	574,34	598,68	557,09	470,97
	421,34	533,34	374,34	623,25	636,96	550,44	538,15	488,41
	423,30	573,66	326,84	605,54	635,72	599,54	545,23	514,00
<b>4000 ng/mL</b>	3924,86	4501,79	3088,49	4010,59	3719,50	3976,96	3795,85	3685,63
	4010,88	4701,62	3259,71	3751,20	3721,47	3899,93	3687,13	4061,80
	4042,64	4482,29	3054,13	4041,83	3857,05	3951,61	4091,65	3871,34